

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

EP 0 957 170 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
17.11.1999 Bulletin 1999/46

(21) Numéro de dépôt: 98201312.

(22) Date de dépôt: 22.04.1998

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/52**, C12P 19/18,
C12N 9/10, C08B 37/00,
C12Q 1/68, C12N 1/21

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Etats d'extension désignés:
AL LT LV MK RO SI

(72) Inventeurs:

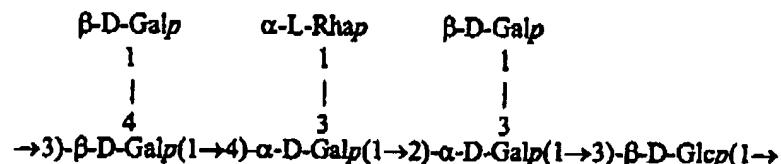
- Lamothe, Gilbert
1012 Lausanne (CH)
- Stengele, Francesca
1018 Lausanne (CH)

(71) Demandeur:
SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.
1800 Vevey (CH)

(74) Mandataire:
Van Malderen, Michel et al
Office van Malderen
Place Reine Fabiola 6/1
1083 Bruxelles (BE)

(54) Identification de gènes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* Lf5 impliqués dans la biosynthèse d'exopolysaccharides

(57) Enzyme recombinée, susceptible d'être impliquée dans la biosynthèse de l'EPS ayant l'unité saccharidique répétitive



catalysant spécifiquement l'une des liaisons suivantes entre sucres: (1) la liaison osidique β -1,3 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 3 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation; (2) la liaison osidique β -1,4 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 4 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation; (3) la liaison osidique α -1,3 entre le carbone 1 d'un L-Rhap activé et le carbone 3 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation; lesdites chaînes étant composées notamment d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et lesdits sucres présents aux extrémités non-réductrices étant liés à un seul autre sucre par son carbone 1. L'invention concerne aussi tout ADN recombinant codant pour une enzyme recombinée selon l'invention, ainsi que toutes cellules comprenant, intégrées dans son génome ou par le moyen d'un plasmide réplicable, un ADN recombiné, et exprimant une enzyme recombinée fonctionnelle selon l'invention. Enfin l'invention concerne un procédé de production d'un EPS, dans lequel (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant pour au moins l'une des enzymes selon l'invention, ledit vecteur comprenant en outre une séquence permettant la réplication autonome ou l'intégration dans une cellule hôte, (2) on transforme une cellule hôte par ledit vecteur, ladite cellule hôte utilisant les enzymes codées par le vecteur, le cas échéant en combinaison avec d'autres enzymes produite par la cellule hôte, pour la biosynthèse d'un EPS, (3) puis on cultive la cellule hôte transformée dans des conditions appropriées pour la production d'un EPS.

EP 0 957 170 A1

EP 0 957 170 A1

Description

[0001] La présente invention se rapporte à de nouvelles fonctions enzymatiques de bactéries lactiques alimentaires, ainsi que de nouveaux enzymes et gènes, impliqués dans la biosynthèse d'exopolysaccharides.

5 [0002] Il est connu que les bactéries lactiques sont susceptibles de produire dans leur milieu de culture deux classes de polysaccharides, à savoir les homopolysaccharides comme les dextrans ou les levanes qui sont constitués par l'assemblage répété d'un seul sucre, et les hétéropolysaccharides appelés communément exopolysaccharides ou EPS (EPS est l'abréviation du terme "exopolysaccharide") constitués par l'assemblage de plusieurs sucres différents formant une unité répétitive (Cerning J., Bactéries lactiques, Vol I, de Rossart H et Luquet F. M., L'orica, 309-329, 1994).

10 [0003] Une bactérie lactique alimentaire produisant un EPS peut conférer un caractère filant et/ou une texture lisse et crémeuse à un lait acidifié (Cerning et al., FEMS Microbiol., 87, 113-130, 1990). Les EPS peuvent aussi présenter des activités biologiques particulièrement intéressantes pour la santé humaine ou animale, comme des activités anti-tumeurs ou probiotiques, par exemple (Oda M. et al., Agric. Biol. Chem., 47, 1623-1625, 1983; EP94870139.6).

15 [0004] Par ailleurs, l'industrie alimentaire est confrontée à une instabilité génétique de la biosynthèse des EPS dans les bactéries lactiques. Ceci se traduit généralement au cours d'une fermentation par la perte de la production d'EPS par tout ou partie des bactéries lactiques (voir "Cerning J." ci-dessus). Les produits fermentés industriels sont ainsi sujets à des variations dans leur contenu en EPS, ce qui n'est pas toujours acceptable. Pour remédier à ces problèmes, l'industrie recourt actuellement à l'isolement et la caractérisation périodique de ses bactéries de manière à séparer celles qui ont perdu leur caractère original.

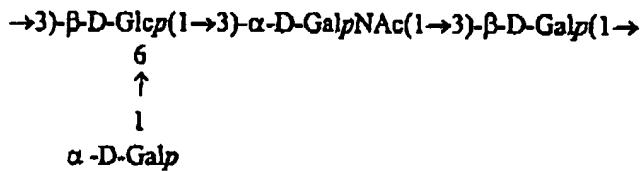
20 [0005] On connaît des gènes de bactéries lactiques alimentaires impliqués dans la biosynthèse d'EPS.

25 [0006] WO92/02142 révèle ainsi l'existence du plasmide pHV67 qui produit dans *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (mésophile) une substance capable d'augmenter la viscosité d'un lait fermenté. La structure saccharidique de cette substance n'étant pas connue, les différentes fonctions des enzymes codées par pHV67 sont également inconnues.

30 [0007] US5066588 décrit deux plasmides provenant d'une souche de *Streptococcus cremoris* (mésophile) capable de conférer un caractère épaisissant à un *Streptococcus lactis*. La structure saccharidique de cet épaisseur n'étant pas connue, les différentes fonctions des enzymes codées par ces plasmides sont également inconnues.

35 [0008] Vescovo et al. ont mis en évidence un plasmide d'une souche *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (mésophile) codant pour un phénotype Muc+, c'est à dire pour des fonctions liées à la production d'épaississants exocellulaires (Vescovo et al., Biotechnology Letters, Vol II, 709-712, 1989). La structure saccharidique de cet épaisseur n'étant pas connue, les différentes fonctions des enzymes codées par ce plasmide sont également inconnues.

[0009] EP750043 (Société des Produits Nestlé) décrit un opéron de gènes de la souche *Streptococcus thermophilus* CNCM 1-1590 impliqué dans la synthèse d'un EPS ayant la structure répétitive suivante.



45

[0010] Des travaux menés sur ces enzymes (résultats non-publiés) ont permis de montrer que la biosynthèse de cet EPS se fait de manière progressive avec, à chaque étape, l'addition d'une nouvelle unité de sucre qui vient s'attacher par sa fonction semi-acétalique à un hydroxyle alcoolique d'une autre unité de sucre, laquelle est à l'extrémité d'une chaîne de sucres liée à une amorce. Ces enzymes catalysent ou contrôlent ainsi spécifiquement les fonctions suivantes.

55 (1) La liaison sous forme d'un isomère α ou β entre le carbone 1 (qui porte la fonction réductrice aldéhyde) d'un D-Galp activé et un phosphate d'une amorce lipophile notamment du genre undécaprénoïl, ou protéique notamment du genre ACP (Acyl Carrier Protein), par exemple.

(2) La liaison osidique α -1,3 entre le carbone 1 d'un GalpNAc activé (UDP-GalpNAc) et le carbone 3 du D-Galp lié à son amorce.

(3) La liaison osidique β -1,3 entre le carbone 1 d'un D-Glc β activé (UDP-D-Glc β) et le carbone 3 du sucre présent

EP 0 957 170 A1

à l'extrémité non-réductrice de la chaîne β -D-Galp(1 \rightarrow 3)- α / β -D-Galp-amorce.

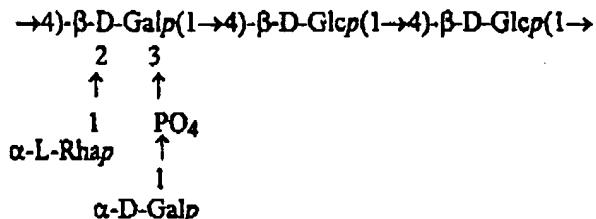
(4) La liaison osidique α -1,6 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 6 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice de la chaîne β -D-Glcp(1 \rightarrow 3) β -D-Galp(1 \rightarrow 3) α / β -D-Galp-amorce.

5 (5) Le transport des unités saccharidiques répétitives de l'EPS décrit ci-dessus à l'extérieur de la cellule bactérienne.

(6) La liaison osidique β -1,3 entre les unités saccharidiques répétitives de l'EPS ci-dessus.

(7) La régulation du nombre d'unités saccharidiques dans l'EPS, et donc de son poids moléculaire final.

[0011] Van Kranenburgh *et al.* ont aussi décrit un opéron de gènes, présent sur un plasmide d'une souche *Lactococcus lactis*, impliqué dans la synthèse d'un EPS ayant la structure répétitive suivante (Mol. Microbiology, 24, 387-397, 1997).



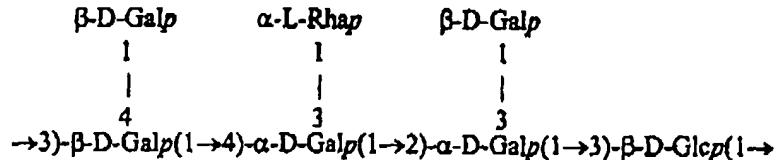
[0012] Bien que les enzymes codant pour cet EPS soient maintenant connues, il reste encore à élucider la spécificité de chaque enzyme. Pour le moment on peut valablement supposer, au regard des homologies avec d'autres opérons impliqués dans la biosynthèse de polysaccharides, que la biosynthèse débute par la liaison d'un Glcp activé sur une amorce lipophilique ou protéique.

[0013] Les connaissances relatives à la biosynthèse des EPS dans les bactéries lactiques alimentaires sont encore néanmoins très fragmentaires. Cependant il est maintenant admis que, basée sur les structures d'EPS élucidées jusqu'à présent et par analogie avec la production de composés tels que les lipopolysaccharides (Whitfield et al., *Adv. Microbiol. Physiol.*, 35, 136-246, 1993), la synthèse débute par l'activation de monomères de sucres (glucose, galactose...) en sucres nucléotidiques utilisés comme précurseurs par les glycosyltransférases. La première étape de la biosynthèse de l'unité répétitive est catalysée par une glycosyltransférase particulière qui reconnaît, d'une part, un précurseur de type sucre nucléotidique et, d'autre part, une amorce lipophile, notamment du genre undécaprénoiphosphate, ou protéique notamment du genre ACP, par exemple. Les autres glycosyltransférases agissent ensuite séquentiellement en ajoutant un sucre spécifique sur l'unité répétitive en construction. Les unités répétitives complètes sont ensuite exportées vers le milieu extracellulaire avant d'être polymérisées.

[0014] A ce jour, il existe toujours un besoin de disposer de nouvelles enzymes impliquées dans la synthèse d'EPS, et notamment des enzymes catalysant des liaisons spécifiques entre des sucres. La présente invention vise à remplir ces besoins.

Résumé de l'invention

[0015] A cet effet, la présente invention concerne toute enzyme recombinée, que l'on peut purifier et qui est susceptible d'être impliquée dans la biosynthèse de l'EPS ayant l'unité saccharidique répétitive suivante,



55

et catalysant spécifiquement:

- la liaison osidique β -1,3 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 3 du sucre présent à l'extrémité non-

EP 0 957 170 A1

réductrice d'une chaîne saccharidique en formation, ladite chaîne étant composée notamment d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et ledit sucre présent à l'extrémité non-réductrice étant lié à un seul autre sucre par son carbone 1;

- la liaison osidique β -1,4 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 4 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation, ladite chaîne étant composée notamment d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et ledit sucre présent à l'extrémité non-réductrice étant lié à un seul autre sucre par son carbone 1;
- la liaison osidique α -1,3 entre le carbone 1 d'un L-Rhap activé et le carbone 3 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation, ladite chaîne étant composée notamment d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et ledit sucre présent à l'extrémité non-réductrice étant lié à un seul autre sucre par son carbone 1.

[0016] Un autre objet de l'invention concerne tout ADN recombiné codant pour une enzyme selon l'invention, et notamment tout vecteur d'ADN ou toute cellule renfermant un tel ADN recombiné, et exprimant une enzyme recombinée fonctionnelle.

[0017] Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'un EPS, dans lequel (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant pour au moins l'une des enzymes selon l'invention, ledit vecteur comprenant en outre une séquence permettant la réplication autonome ou l'intégration dans une cellule hôte, (2) on transforme une cellule hôte par ledit vecteur, ladite cellule hôte utilisant les enzymes codées par le vecteur, le cas échéant en combinaison avec d'autres enzymes produite par la cellule hôte, pour la biosynthèse d'un EPS, (3) puis on cultive la cellule hôte transformée dans des conditions appropriées pour la production d'un EPS.

[0018] Enfin, un dernier objet de la présente invention concerne l'utilisation d'une enzyme recombinée selon l'invention, ou d'un ADN selon l'invention, pour la synthèse d'un EPS.

25 Description de la figure

[0019] La figure 1 représente la carte physique de l'opéron impliqué dans la synthèse de l'EPS de la souche *S. thermophilus* CNCM I-800. Les flèches horizontales indiquent la présence de cadres de lectures (ORF) potentiels. Les noms des gènes correspondants aux ORFs sont indiqués en dessous des flèches.

30 Description détaillée de l'invention

[0020] Dans la suite de la description, les séquences en nucléotides des gènes ou amores utilisés, ainsi que les séquences en acides aminés des enzymes recombinées, sont représentées dans la liste de séquence fournie ci-après, et sont nommées, pour des raisons de simplification, sous les sigles numérotés "SEQ ID NO".

[0021] Le terme "EPS" désigne un polymère formé par la condensation d'un grand nombre de molécules de sucres (= oses) de types différents. Cet EPS est plus particulièrement constitué par l'assemblage répété d'une seule unité saccharidique, elle-même formée d'une chaîne principale de sucres dont les extrémités sont impliquées dans la polymérisation des unités. Cette chaîne principale peut comprendre en outre des ramifications de sucres qui ne sont pas impliquées dans la polymérisation des unités, lesdites ramifications étant greffées par des liaisons osidiques sur un ou plusieurs sucres de cette chaîne.

[0022] On représente une unité saccharidique en indiquant (1) les sigles usuels des sucres (Glc: glucose; Gal: galactose; Rha: rhamnose; etc.) ; (2) le type de chaque liaison osidique sous la forme d'une flèche entre les numéros de carbone de deux sucres adjacents (les numéros de carbone attribués sur le cycle d'un sucre étant ceux reconnus par la nomenclature internationale des sucres: IUPAC) ; (3) l'anomérie de chaque liaison osidique sous la forme du sigle α ou β , ledit sigle étant positionné à gauche d'un sucre pour indiquer l'anomérie de la liaison osidique présente à la droite de ce sucre; (4) la nature pyranose ou furanose de chaque sucre en adjoignant la lettre *p* ou *f* juste après le sigle de chaque sucre ; (5) et la série D ou L de chaque sucre, en positionnant la lettre à gauche du sucre concerné.

[0023] Dans une chaîne saccharidique en formation, la réaction directe entre une fonction semi-acétalique d'une nouvelle unité de sucre et un hydroxyle alcoolique du sucre présent à l'extrémité non-réductrice de la chaîne ne se fait spontanément, et c'est pourquoi le groupement semi-acétalique doit au préalable être activé, c'est-à-dire rendu plus réactif en vue de la formation de la liaison osidique. Cette activation est catalysée par des enzymes bactériennes formant un sucre nucléotidique, et plus particulièrement un uridine-diphosphate de D-GlcP (UDP-GlcP) ou D-GalP (UDP-GalP), ou une thymidine-diphosphate de L-Rhap (TDP-Rhap) dans le contexte de la présente invention. Pour initier la formation d'un chaîne saccharidique, un premier sucre activé doit d'abord être lié sur le phosphate d'une amorce lipophile ou protéique. L'addition d'une nouvelle unité de sucre activé sur la chaîne se fera ensuite par sa fonction semi-acétalique au niveau d'un hydroxyle alcoolique du sucre présent à l'extrémité non-réductrice de cette chaîne, c'est-à-dire à l'extrémité opposée de celle où l'amorce est fixée.

EP 0 957 170 A1

[0024] Dans la suite de la description, on représente une chaîne saccharidique en formation, en indiquant les sigles usuels des sucres, les types de liaisons osidiques (y compris l'anomérie), la position de l'amorce sur la chaîne, la nature du cycle et de la série D ou L de chaque sucre. Du fait que l'on ne sait pas encore quel isomère est formé lorsque le premier sucre d'une chaîne est lié à une amorce, par commodité d'écriture, on utilise aussi le sigle " α/β " afin d'indiquer que l'un des deux isomères est formé. L'emplacement d'une ramifications sur une chaîne saccharidique peut être également indiqué dans une chaîne par la présence de crochets à l'intérieur desquels les sucres, les types de liaisons osidiques et la nature du cycle et de la série D ou L de chaque sucre sont représentés, chaque crochet étant positionné à gauche du sucre sur lequel la ramifications est greffée.

[0025] Au sens de la présente invention, on entend par "séquence homologue" toute séquence nucléotidique ou d'acides aminés, conduisant ou donnant un variant d'enzyme qui catalyse l'assemblage de sucres, ne différant des séquences selon l'invention que par la substitution, la délétion ou l'addition d'un petit nombre de bases nucléotidiques ou d'acides aminés, par exemple 1 à 150 paires de bases (pb) ou 1 à 50 acides aminés. Ces variants d'enzyme peuvent conserver la même spécificité d'assemblage de sucres que les enzymes dont ils dérivent. La substitution, la délétion ou l'addition d'un petit nombre d'acides aminés peut cependant aussi conduire à changer la spécificité enzymatique.

[0026] La sélection d'une séquence homologue est considérée comme évidente pour l'homme du métier, puisque l'on peut facilement créer des variants d'enzymes selon l'invention, en mettant en œuvre des méthodes de mutagénèse classiques, et notamment en adaptant les méthodes décrites par Adams *et al.* (EP402450; Genencor), par Dunn *et al.* (Protein Engineering, 2, 283-291, 1988), par Greener *et al.* (Strategies, 7, 32-34, 1994) et/ou par Deng *et al.* (Anal. Biochem, 200, 81, 1992), par exemple.

[0027] Dans ce cadre, on considérera en particulier comme homologues deux séquences d'ADN qui, du fait de la dégénérescence du code génétique, codent pour un même polypeptide. De même, on peut aussi considérer comme homologue deux séquences d'ADN s'hybridant dans des conditions stringentes, c'est-à-dire s'hybridant toujours après une étape d'hybridation à 65°C pendant 15h dans un tampon d'hybridation (SSPE 1,5x 0,225 M de NaCl, 0,0015 M d'EPTA, 0,015 M de NaH₂PO₄, pH7 ; 1% de SDS et 1% de lait déshydraté), suivie de 6 étapes successives de lavage à 65°C dans un tampon comprenant différentes dilutions de SSC 10x (1,5 M de NaCl, 0,15 M de citrate de sodium, pH7) et 0,1% SDS, respectivement pendant 2 fois 10 min avec du SSC 2x, pendant 2 fois 10 min avec du SSC 1x, et pendant 2 fois 5 min avec du SSC 0,1x.

[0028] On peut aussi considérer comme homologues les séquences d'ADN présentant plus de 50% d'identité avec les séquences selon l'invention, en particulier plus de 70%, l'identité étant déterminée par le rapport entre le nombre de bases nucléotidiques d'une séquence homologue qui sont identiques à celles d'une séquence selon l'invention, et le nombre total de bases nucléotidiques de ladite séquence selon l'invention, par exemple.

[0029] De même, on considérera comme homologues deux protéines fonctionnelles qui sont reconnues par un même anticorps, le rapport des valeurs d'intensité de reconnaissance des deux protéines par l'anticorps n'excédant pas 1000 dans un test ELISA, de préférence 100, par exemple. On considérera plus particulièrement comme homologues les séquences en acides aminés qui présentent plus de 70% d'identité avec les séquences selon l'invention, en particulier plus de 80% ou 90%. Dans ce dernier cas, l'identité est déterminée par le rapport entre le nombre d'acides aminés d'une séquence homologue qui sont identiques à celles d'une séquence selon l'invention, et le nombre total d'acides aminés de ladite séquence selon l'invention.

[0030] Pour isoler un ADN recombiné selon la présente invention, il est possible de constituer une banque de grands fragments d'ADN d'une bactérie lactique produisant un EPS dans une bactérie lactique ne produisant pas d'EPS, puis de sélectionner le ou les clone(s) produisant un EPS. Pour cela, on digère l'ADN génomique d'une bactérie lactique produisant un EPS par une enzyme de restriction qui est spécifique d'un site de restriction relativement rare (*Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I) ou par une digestion partielle avec *Sau*3A, par exemple. On clone le produit de digestion dans un plasmide d'expression ou d'intégration qui accepte de grands fragments (plasmide pSA3, Dao *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 49, 115-119, 1985), on introduit les plasmides recombinants dans une espèce identique ou proche ne produisant pas d'EPS, telle que *Lactobacillus helveticus* ou *Lactococcus lactis*. Enfin on sélectionne au moins un clone transformé produisant un EPS, puis on identifie, on isole et on séquencera classiquement le fragment d'ADN responsable de la production d'EPS.

[0031] Vu que les ADN recombinés selon la présente invention sont susceptibles d'être de grande taille, du fait qu'ils peuvent contenir un groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse d'EPS, on peut préférer introduire les plasmides recombinants dans la même souche de bactérie lactique dont proviennent les fragments, à la différence près que cette souche a perdu la capacité de produire des EPS suite à un traitement mutagénique (traitement U.V., chimique ou par transposon).

[0032] Une autre alternative consiste à préparer des amorces nucléotidiques dérivées de gènes connus impliqués dans la biosynthèse d'un EPS, puis à réaliser une PCR sur l'ADN génomique d'une bactérie lactique produisant un EPS et pour laquelle on désire identifier les gènes impliqués dans la biosynthèse de cet EPS. Cette technique est cependant excessivement difficile à mettre en œuvre, car le choix de la séquence nucléotidique des amorces sera déterminante dans l'isolement d'un gène. Puisque l'on ne connaît pas d'avance les homologies entre les gènes recherchés et les

EP 0 957 170 A1

gènes connus, ce choix procède d'une démarche inventive, de par la nécessaire sélection opérée parmi une multiplicité d'amorces possibles.

5 d'amorces possibles.

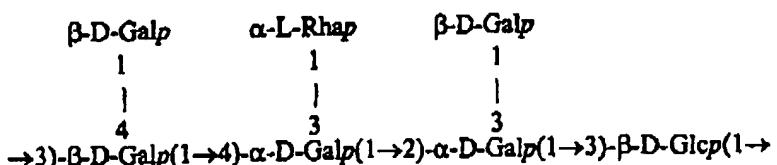
[0033] Quelques critères peuvent cependant être retenus, tel que (1) la sélection d'une fonction enzymatique retrouvée souvent lors de la biosynthèse d'un EPS ; (2) la sélection de séquences nucléotidiques conservées en comparant des gènes de diverses bactéries codant pour cette fonction enzymatique ; (3) la sélection de séquences conservées dont le contenu en nucléotides GC se rapproche le plus possible de l'organisme cible, même si pour cela on doit prendre comme point de départ de la sélection des séquences nucléotidiques retrouvées dans des organismes éloignés phylologiquement de l'organisme cible (*E. coli*) ; (4) l'identification d'une partie dans les séquences conservées qui est naturellement plus riche en nucléotides GC ; (5) l'identification d'une partie dans les séquences conservées qui est peu 10 dégénérée, c'est-à-dire codant pour des acides aminés qui sont eux-mêmes codées naturellement par 1 ou 2 codons, tels que la tyrosine, la tryptophane, la glutamine ou l'acide glutamique, par exemple ; etc.

tel que la méthionine, la tryptophane, la glutamine ou l'acide glutamique, par exemple ; etc. [0034] Il faut remarquer que les méthodes de sélection décrites brièvement ci-dessus peuvent être appliquées à toutes les bactéries lactiques connues, notamment aux bactéries lactiques mésophiles comme par exemple *Streptococcus* *cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* et *Lactobacillus sake*, et les bactéries lactiques thermophiles comme par exemple *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lactobacillus helveticus*. A cet effet, l'homme du métier dispose de techniques de transformation pour chaque espèce de bactérie lactique, et en particulier pour *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Sasaki Y. et al., FEMS Microbiology Reviews, 12, Fourth Symposium on Lactic Acid Bacteria, Noodwijkherhout, The Netherlands, Sept 1993; Satoh et al., Ann. Environ. Microbiol. 63, 4593-4596, 1997).

20 Appl. Env. Microb., 33, 4593-4598, 1977.
[0035] De plus, les méthodes de sélection décrites ci-dessus permettent le plus souvent d'isoler seulement une partie d'un gène ou d'un groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse d'un EPS. Néanmoins, l'homme du métier peut facilement identifier la partie restante du gène ou du groupe de gènes en sélectionnant dans une banque chromosomique, à l'aide de sondes nucléiques basées sur un fragment isolé, un ou plusieurs clones renfermant la partie restante, par exemple.

exemple.
25 [0036] On a pu ainsi caractériser une séquence d'ADN de 9,2 kb de la souche *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* Sfi5 déposée le 4 octobre 1988 selon le traité de Budapest, auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganisme (C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France, où elle a reçu le numéro de dépôt CNCM I-800. Par ailleurs, cette souche Gram-positif présente au microscope un aspect de bâtonnets non-flagellés. Cette souche est non-sporulante et anaérobie facultative. Toutes les restrictions concernant la disponibilité de cette souche seront irrévocablement levées lors de la délivrance d'un brevet correspondant à la présente demande ou une autre demande qui revendique le bénéfice de priorité sur cette demande.

[0037] Cette séquence de 9,2 kb comprend des gènes codant pour de nouvelles enzymes impliquées dans la synthèse de l'EPS ayant la structure répétée suivante.



[0038] Grâce aux connaissances acquises sur la biosynthèse des EPS décrits dans la littérature, notamment de l'EPS décrit dans EP750043 (résultats non-publiés), on a pu ainsi identifier les nouvelles fonctions enzymatiques impliquées dans la biosynthèse de l'EPS ci-dessus. Les nouvelles enzymes impliquées dans la synthèse de cet EPS peuvent ainsi catalyser spécifiquement l'une des nouvelles liaisons suivantes entre sucres:

- la liaison osidique β -1,3 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 3 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation, ladite chaîne étant composée notamment d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et ledit sucre présent à l'extrémité non-réductrice étant lié à un seul autre sucre par son carbone 1;
- la liaison osidique β -1,4 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 4 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation, ladite chaîne étant composée notamment d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et ledit sucre présent à l'extrémité non-réductrice étant lié à un seul autre sucre par son carbone 1;

EP 0 957 170 A1

- la liaison osidique α -1,3 entre le carbone 1 d'un L-Rhap activé et le carbone 3 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation, ladite chaîne étant composée notamment d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et ledit sucre présent à l'extrémité non-réductrice étant lié à un seul autre sucre par son carbone 1.

5

[0039] La chaîne saccharidique en formation peut être composée simplement d'une chaîne principale sans ramifications de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3.

[0040] A titre d'exemple, cette chaîne peut être choisie parmi les chaînes tetra-saccharidiques suivantes, ainsi que leurs précurseurs mono-, di-, ou tri-saccharidique(s):

10

α -D-Galp(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcP(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- α / β -D-Galp-amorce;
 α -D-Galp(1 \rightarrow 2)- α -D-Galp(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcP(1 \rightarrow 3)- β / α -D-Galp-amorce;
 β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- α -D-Galp(1 \rightarrow 2)- α -D-Galp(1 \rightarrow 3)- β / α -D-GlcP-amorce ; et
 β -D-GlcP(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- α -D-Galp(1 \rightarrow 2)- β / α -D-Galp-amorce.

15

[0041] La chaîne saccharidique en formation peut être aussi composée d'une chaîne principale comprenant en outre 1 ou 2 sucres ramifiés, tels que D-Galp et/ou L-Rhap. Ces sucres ramifiés peuvent être liés sur la chaîne principale en β -1,3, β -1,4 ou α -1,3, par exemple.

[0042] A titre d'exemple, cette chaîne peut être choisie parmi les chaînes principales tetra-saccharidiques suivantes, ainsi que leurs précurseurs mono-, di-, ou tri-saccharidique(s):

25

α -D-Galp(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcP(1 \rightarrow 3)-[β -D-Galp(1 \rightarrow 4)]- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)-[α -L-Rhap(1 \rightarrow 3)]- α / β -D-Galp-amorce;
 α -D-Galp(1 \rightarrow 2)-[β -D-Galp(1 \rightarrow 3)]- α -D-Galp(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcP(1 \rightarrow 3)-[β -D-Galp(1 \rightarrow 4)]- β / α -D-Galp-amorce;
 β -D-Galp(1 \rightarrow 4)-[α -Rhap(1 \rightarrow 3)]- α -D-Galp(1 \rightarrow 2)-[β -D-Galp(1 \rightarrow 3)]- α -D-Galp(1 \rightarrow 3)- β / α -D-GlcP-amorce; et
 β -D-GlcP(1 \rightarrow 3)-[β -D-Galp(1 \rightarrow 4)]- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)-[α -L-Rhap(1 \rightarrow 3)]- α -D-Galp(1 \rightarrow 2)-[β -D-Galp(1 \rightarrow 3)]- β / α -D-Galp-amorce.

30

[0043] De préférence, une des nouvelles enzymes selon l'invention catalyse la liaison osidique α -1,3 entre le carbone 1 d'un L-Rhap activé et le carbone 3 du galactose présent à l'extrémité non-réductrice d'une des chaînes saccharidiques ci-dessus.

[0044] De préférence, une des nouvelles enzymes selon l'invention catalyse la liaison osidique β -1,3 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 3 du galactose présent à l'extrémité non-réductrice d'une des chaînes saccharidiques ci-dessus.

35

[0045] De préférence aussi, une des nouvelles enzymes selon l'invention catalyse la liaison osidique β -1,4 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 4 du galactose présent à l'extrémité non-réductrice d'une des chaînes saccharidiques ci-dessus.

40

[0046] Les nouvelles enzymes recombinées, identifiées à partir de la séquence d'ADN de 9,2 kb, ont l'une des séquences en acides aminés choisie dans le groupe de séquences SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, et les séquences qui leur sont homologues.

45

[0047] La présente invention vise également tout ADN recombiné codant pour une enzyme selon l'invention, c'est à dire l'une des enzymes choisie dans le groupe de séquences SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 et SEQ ID NO:10. En particulier, cet ADN peut comprendre au moins un gène ayant l'une des séquences nucléotidiques choisie parmi les séquences délimitées dans la séquence SEQ ID NO:1 par les nucléotides 9-353, 516-1292, 1323-1982, 2074-3174, 3246-4379, 4511-5317, 5335-6204, 6709-7692, 7723-8784, et les séquences qui leur sont homologues.

50

[0048] La présente invention vise aussi tout vecteur recombinant comprenant un ADN selon l'invention. Ce vecteur recombinant peut être tout fragment d'ADN, simple ou double brin, linéaire ou circulaire, d'expression ou d'intégration, et comprenant une séquence d'ADN selon l'invention, notamment tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1. Dans le cas où le procédé décrit dans EP564966 ne serait pas utilisé (voir ci-après), il faut veiller à ce que le vecteur puisse exprimer l'ADN selon l'invention par des séquences nucléotidiques adaptées (promoteur; site d'attachement du ribosome; codon préféré par l'organisme hôte, etc.), et le cas échéant à ce qu'il comprenne une ou plusieurs origines de réplication cellulaire, notamment d'*Escherichia coli* et/ou d'un *Streptococcus*, par exemple.

55

[0049] Ainsi, pour opérer la biosynthèse d'un EPS, on peut intégrer tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1 comprenant au moins un des gènes précités dans une cellule hôte au moyen du procédé décrit dans EP564966, ledit procédé étant incorporé par référence dans l'enseignement de la présente invention. En résumé, ce procédé permet de pouvoir (1) transformer la cellule hôte avec un plasmide donneur qui ne s'y réplique pas, ledit plasmide comprenant ledit fragment placé fonctionnellement (le cadre de lecture est conservé) dans une partie d'un opéron issu de la cellule

EP 0 957 170 A1

hôte; (2) identifier les transformants ayant intégré la totalité du plasmide; (3) sélectionner des transformants ayant uniquement intégré dans le chromosome le fragment selon l'invention, les autres séquences du plasmide s'étant excisées du chromosome; (4) et cultiver les transformants sélectionnés dans des conditions appropriées pour la production d'un EPS.

5 [0050] On peut noter que ce procédé permet de ne pas utiliser des séquences promotrice et d'activation traductionnelle fonctionnelles. De plus, les conditions de culture appropriées pour la production d'EPS sont à la portée de l'homme du métier, qui peut utiliser des milieux de culture standards, et choisir le pH, la température et l'agitation du milieu optimum selon la souche utilisée.

10 [0051] On peut aussi choisir de cloner tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1 comprenant au moins un des gènes précités dans un plasmide d'expression autoréplicatif en aval de séquences promotrice et d'activation traductionnelle fonctionnelles, et le cas échéant en amont d'un terminateur, puis de transformer une cellule hôte par le plasmide recombinant.

15 [0052] On peut aussi utiliser les enzymes recombinées pour modifier ou synthétiser *in vitro* un oligosaccharide ou un polysaccharide comme un EPS, par exemple. Pour cela, il est préférable de purifier au moins une de ces enzymes, en surexprimant classiquement leur gène dans une cellule, et en les isolant classiquement, par précipitation et/ou chromatographie (du milieu de culture et/ou de la partie membranaire des cellules), par exemple.

20 [0053] Un autre objet de la présente invention concerne une cellule comprenant, intégré dans son génome ou par le moyen d'un plasmide réplicable, un ADN recombiné selon l'invention, et exprimant une enzyme recombinée fonctionnelle selon l'invention. Cette cellule peut faire partie du groupe des moisissures, des levures, des bactéries et des plantes, par exemple. De préférence, les levures appartenant aux genres *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* et *Pichia*; les bactéries sont Gram négative ou positive appartenant au genre *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*; les cellules de plantes appartiennent aux légumineuses, et aux espèces céréalières et ligneuses; tandis que les moisissures sont les cellules traditionnellement utilisées pour préparer un koji comme les *Aspergillus*, *Rhizopus* et/ou *Mucor*.

25 [0054] Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de production d'un EPS, dans lequel (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant pour au moins l'une des enzymes selon l'invention, ledit vecteur comprenant en outre une séquence permettant la réplication autonome ou l'intégration dans une cellule hôte; (2) on transforme une cellule hôte par ledit vecteur, ladite cellule hôte utilisant les enzymes codées par le vecteur, le cas échéant en combinaison avec d'autres enzymes produites par la cellule hôte si le vecteur n'apporte pas tous les enzymes nécessaires à la biosynthèse d'un EPS, pour la biosynthèse d'un EPS; (3) puis on cultive la cellule hôte transformée dans des conditions appropriées pour la production d'un EPS.

30 [0055] Si l'on ne met pas en œuvre le procédé décrit dans EP564966, le vecteur doit alors comprendre en outre au moins une séquence promotrice fonctionnelle et au moins une séquence d'activation traductionnelle fonctionnelle, permettant l'expression des gènes codant pour au moins l'une des enzymes selon l'invention.

35 [0056] La présente invention est décrite plus en détail ci-après à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention de fragments d'ADN, de plasmides recombinants et de bactéries transformées selon l'invention. Ces exemples sont précédés d'une description des milieux de culture. Il va de soi, toutefois, que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation. La manipulation de l'ADN, le clonage et la transformation de cellules bactériennes sont, en l'absence de précisions contraires, effectués selon les protocoles décrits dans l'ouvrage de Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989). Les pourcentages sont donnés en poids/poids, sauf indication contraire.

Milieux: (ajouter 1,5% de Bacto-agar pour un milieu solide)

45 [0057]

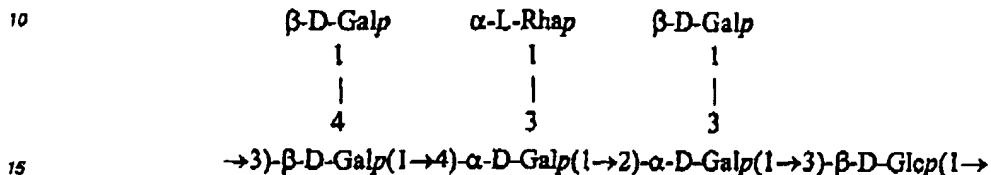
- M17 (Difco, USA): tryptone 0,5%, soytone 0,5%, viande hydrolysée 0,5%, extrait de levure 0,25%, acide ascorbique 0,05%, sulphate de magnésium 0,025%, disodium-beta-glycérophosphate 1,9% et de l'eau.
- 50 - LM17: milieu M17 comprenant 1% de lactose.
- GM17: milieu M17 comprenant 1% de glucose.
- MSK: lait écrémé (poudre reconstituée à 10%) comprenant 0,1% d'extrait de levure.
- LB: tryptone 0,5%, extrait de levure 0,25%, et NaCl 1%.

EP 0 957 170 A1

Exemple 1 clonage de l'operon de *L. bulgaricus* CNCM I-800 impliqué dans la synthèse d'un EPS

[0058]

5 **1.1. Structure répétée de l'EPS:** la structure de l'EPS produit par la souche *L. bulgaricus* Lfi5 (CNCM I-800) a été déterminée par résonnance magnétique, selon une technique similaire à celles décrites dans EP 97111379.0 et EP 97111381.6. Les résultats montrent que l'EPS est constitué de l'unité répétitive suivante:

20 **1.2. Clonage:**

L'approche tentée afin d'isoler les gènes *eps* de la souche Lfi5 est basée sur la comparaison de gènes *eps* connus (ceux de *S. thermophilus*) et de leurs homologues (gènes *cap*, *cps*, *rib*) d'espèces variées, et même d'espèces non-apparentées phylogéniquement, comme des espèces Gram-négatif. Ces comparaisons permettent ainsi de définir des régions conservées entre les espèces, et d'utiliser des amores nucléotidiques dérivées de ces régions conservées afin d'amplifier par PCR une partie interne de l'opéron *eps* de la souche Lfi5. Cette approche s'est malheureusement heurtée à une impossibilité d'amplifier un gène *eps*, quel que soit les amores choisies. Les raisons ayant conduit à ces échecs peuvent être multiples, par exemple liées à une faible homologie entre les gènes *eps* de la souche Lfi5 et ceux des régions conservées, ou à des conditions de PCR inadéquates, etc.

25 Face à ces échecs, on a décidé de sélectionner, puis d'utiliser dans une PCR, des amores nucléotidiques particulièrement dégénérées. Le choix de ces amores spécifiques a en fait été déterminant pour l'amplification d'un gène *eps* de la souche Lfi5, et a été motivé par les considérations suivantes: (1) la sélection d'une fonction enzymatique retrouvée souvent lors de la biosynthèse d'un EPS; (2) la sélection de séquences nucléotidiques conservées en comparant des gènes de diverses bactéries codant pour cette fonction enzymatique; (3) la sélection de séquences conservées dont le contenu en nucléotides GC se rapproche le plus possible de l'organisme cible, même si pour cela on doit prendre comme point de départ de la sélection des séquences nucléotidiques retrouvées dans des organismes éloignés phylogéniquement de l'organisme cible (*E. coli*); (4) l'identification d'une partie dans les séquences conservées qui est naturellement plus riche en nucléotides GC; (5) l'identification d'une partie dans les séquences conservées qui est peu dégénérée, c'est-à-dire codant pour des acides aminés qui sont eux-mêmes codés naturellement par 1 ou 2 codons, tel que la méthionine, le tryptophane, la glutamine ou l'acide glutamique, par exemple; etc.

30 Parmi les amores testés, celles ayant les séquences nucléotidiques SEQ ID NO:11 et SEQ ID NO:12, ont permis d'amplifier un fragment de gène *eps* dans les conditions de PCR suivantes: successivement 2 min à 95°C, 1 min à 42°C, 20 s à 72°C, puis 35 fois de suite le cycle de 30 s à 94°C, 1 min à 42°C et 20 s à 72°C. Pour cela, l'ADN génomique de la souche Sfi39 a été au préalable isolée selon la technique de Slos *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., 57, 1333-1339, 1991). On utilise environ 100 ng d'ADN génomique et la Taq polymérase.

35 Un fragment de PCR de 143 pb a ainsi pu être isolé, puis cloné dans le plasmide linéarisé pGEMT (Promega, USA). Le séquencage de ce fragment par la méthode des didéoxynucléotides (kit f-mol® DNA Sequencing System, Promega) indique une séquence correspondant aux nucléotides 1698 à 1841 de la séquence SEQ ID NO:1.

40 Ce fragment de PCR a été utilisé pour cribler une banque λ -ZAP Express (Stratagene, USA) renfermant des fragments d'ADN de la souche Lfi5. Pour cela, selon les recommandations du fournisseur on digère partiellement une préparation d'ADN ducit mutant par *Sau3A*, on sépare les fragments par une électrophorèse sur gel d'agarose, on coupe du gel les bandes correspondants à des fragments de 5 à 12 kb, on élue l'ADN, puis on le lie au vecteur λ -ZAP Express préalablement digéré par *Bam*HI. On encapside *in-vitro* le produit de ligation à l'aide du système GigagoldIII (Stratagene), on mélange ensuite les phages avec des *Escherichia coli* XL1Blue (Stratagene) selon les recommandations du fournisseur, puis on étale le mélange sur boîte de Pétri. On analyse ensuite les plaques recombinantes par hybridation de leur ADN transféré sur une membrane Hybond-N (Amersham Life Sciences, UK) avec le fragment de PCR préalablement rendu radioactif (kit Random Primed DNA Labeling, Boehringer-Manheim).

EP 0 957 170 A1

5 Parmi les nombreuses plaques recombinantes, on a pu sélectionner par hybridation plusieurs plaques positives, desquelles on a ensuite isolé les vecteurs λ -ZAP Express, puis excisé les vecteurs pBK-pCMV (pCMV) renfermant l'insert chromosomique (voir les recommandations du fournisseur Stratagene). On a ensuite séquencé les inserts chromosomiques de ces vecteurs pCMV (kit f-mol[®] DNA Sequencing System). On a pu ainsi caractériser une séquence de 6 kb correspondant à l'opéron de la souche Lf5 impliqué dans la synthèse d'un EPS.

10 Afin de récupérer les séquences bordant le fragment initial de 6 kb, d'autres criblages de la banque Lambda Zap ont été effectués mais aucun n'a permis d'isoler de nouveaux fragments. Certaines séquences de *Lb. bulgaricus* contenant par exemple des promoteurs sont connues pour être toxiques et donc instables chez *E. coli*. Cela explique sûrement les difficultés à isoler les fragments d'ADN adjacents. Afin de contourner cet obstacle et de cloner les régions d'ADN bordant ce clone, les techniques de PCR réverse et de SSP-PCR (Single Specific Primer PCR) ont été utilisées. Cela a permis d'amplifier plusieurs fragments correspondant aux extrémités 5' et 3' de l'opéron eps. En recoupant les séquences nucléotiques des différents fragments chromosomiques isolés, on a pu ainsi caractériser une séquence de 9,2 kb (voir la figure 1). La séquence nucléotidique de ce fragment de 9,2 kb est représentée dans la séquence SEQ ID NO:1 ci-après.

15 1.3. Analyse de la séquence SEQ ID NO: 1: la séquence SEQ ID NO:1 présente l'opéron eps de la souche Lf5. Cette séquence comprend 9 ORFs complets, dans la même orientation, que l'on appelle eps1, eps2, eps3, eps4, 20 eps5, eps6, eps7, eps8 et eps9 (voir la figure 1). La comparaison des séquences en acides aminés codées par les ORFs avec celles de protéines présentes dans la banque de données Swiss-Prot, à l'aide des logiciels FASTA, PEPPILOT et PILEUP de GCG-software, Wisconsin, USA, permet de déduire la fonction de ces protéines. Les résultats sont présentés ci-après.

25 [0059] L'ORF eps1 (nucléotides 1323-1982) code pour une protéine (SEQ ID NO:2) ayant environ 45% d'identité avec la protéine Cps14E de *Streptococcus pneumoniae* (Genbank, n°P72513). Cet ORF code ainsi de toute évidence pour une galactosyl- ou glucosyl-phospho-transférase catalysant le transfert du premier sucre sur le transporteur lipidique ou protéique.

30 [0060] L'ORF eps2 (nucléotides 2074-3174) code pour une protéine (SEQ ID NO:3) ayant environ 30% d'identité avec la protéine EpsF de *Streptococcus thermophilus* (Genbank, n°Q55043). Cet ORF code ainsi de toute évidence pour une alpha-glycosyltransférase.

35 [0061] L'ORF eps3 (nucléotides 3246-4373) code pour une protéine (SEQ ID NO:4) ayant environ 34% d'identité avec la protéine EpsG de *Streptococcus thermophilus* (Genbank, n°Q56044). Cet ORF code ainsi de toute évidence pour une alpha-glycosyltransférase.

40 [0062] L'ORF eps4 (nucléotides 4511-5317) code pour une protéine (SEQ ID NO:5) ayant environ 7% d'identité avec la protéine YveO de *Bacillus subtilis* (Genbank, n°P71054). Cet ORF code ainsi de toute évidence pour une beta-glycosyltransférase.

45 [0063] L'ORF eps5 (nucléotides 5335-6204) code pour une protéine (SEQ ID NO:6) ayant environ 30% d'identité avec la protéine Cps14K de *S. pneumoniae* (Genbank, n°O07341). Cet ORF code ainsi de toute évidence pour une glycosyltransférase.

50 [0064] L'ORF eps6 (nucléotides 6709-7692) code pour une protéine (SEQ ID NO:7) ayant environ 33% d'identité avec la protéine Eps I de *S. thermophilus* (GenBank n°Q56046). Cet ORF code ainsi de toute évidence pour une beta-glycosyltransférase.

55 [0065] L'ORF eps7 (nucléotides 9-353) code pour une protéine (SEQ ID NO:8) ayant environ 38% d'identité avec la protéine EpsB *Lactococcus lactis* (GenBank n°O06030). Cet ORF code ainsi probablement pour une protéine de régulation impliquée dans le contrôle du poids moléculaire et/ou la longueur de la chaîne polysaccharidique.

60 [0066] L'ORF eps8 (nucléotides 516-1292) code pour une protéine (SEQ ID NO:9) ayant environ 38% d'identité avec la protéine EpsC *Lactococcus lactis* (GenBank n°O06031). Cette homologie confirme le rôle de cet ORF dans la synthèse d'un EPS.

65 [0067] L'ORF eps9 (nucléotides 7723-8784) code pour une protéine (SEQ ID NO:10) ayant environ 24% d'identité avec la protéine YveQ *Bacillus subtilis* (GenBank n°P71056). Cet ORF code ainsi probablement pour une protéine responsable de la polymérisation des unités répétées.

70 [0068] En conclusion, les homologies observées indiquent que les différents ORFs identifiés dans les inserts chromosomiques sont impliqués dans la biosynthèse de l'EPS.

Exemple II Biosynthèse d'un EPS

75 [0069] On prépare un plasmide à partir du plasmide pSA3 (Dao et al., Appl. Environ. Microbiol., 49, 115-119, 1985), en ajoutant un fragment d'ADN de la souche Lf5 contenant la séquence de 9,2 kb décrite à l'exemple I (voir la liste de séquence), et en ajoutant les parties régulatrices de l'opéron eps de la souche *S. thermophilus* Sf6 (EP750043), de

EP 0 957 170 A1

sorte que l'expression (la transcription et la traduction) des gènes *eps* de la souche *Lf5* puisse être effectuée dans *S. thermophilus*. On transforme ensuite par électroporation, avec ce plasmide, la souche *S. thermophilus* CNCM I-1422 qui a été déposée le 18 mai 1994 selon le traité de Budapest. N'importe qu'elle autre souche filante *S. thermophilus* aurait pu aussi être utilisée. Cette souche présente au microscope un aspect de coques non flagellées formant des chaînettes, elle ne fait pas de spores, elle est anaérobiose facultative, et elle produit un EPS ayant la composition Glc:Gal=2:2.

Exemple III Biosynthèse d'un EPS

10 [0070] On prépare un plasmide à partir du plasmide pSA3, en ajoutant un fragment d'ADN de la souche *Lf5* contenant la séquence de 9,4 kb décrite à l'exemple I (voir la liste de séquence), et en ajoutant les parties régulatrices de l'opéron *eps* de la souche *S. thermophilus* *Sf5* (EP750043), de sorte que l'expression (la transcription et la traduction) des gènes *eps* de la souche *Lf5* puisse être effectuée dans *S. thermophilus*. On transforme ensuite par électroporation, avec ce plasmide, la souche *S. thermophilus* CNCM I-1351 qui a été déposée le 5 août 1993 selon le traité de Budapest. N'importe qu'elle autre souche filante *S. thermophilus* aurait pu aussi être utilisée. Cette souche présente au microscope un aspect de coques non flagellées formant des chaînettes, elle ne fait pas de spores, elle est anaérobiose facultative, et elle produit un EPS ayant la composition Glc:Gal:Rha=1:3:2.

Exemple IV Biosynthèse d'un EPS

20 [0071] On isole de l'ADN chromosomal de la souche CNCM I-800, on digère la préparation d'ADN par *Xba*I, on sépare les fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose 0,7%, on élue les fragments de plus de 9 kb, on lie l'ADN extrait au vecteur pJIM2279 (obtenu de P. Renault, INRA, Jouy-en-Josas, Paris, France) préalablement digéré par *Xba*I puis déphosphorylé. On transforme la souche *Lactococcus lactis* MG1363 (J. Bacteriol., 154, 1-9, 1983), cultivée sur milieu GM17 à 30°C, par la méthode de De Vos et al. (Gene, 85, 169-176, 1989). On sélectionne les clones transformés par hybridation de l'ADN génomique des clones avec l'une des sondes dérivées de la séquence SEQ ID NO:1.

Exemple V Préparation de gènes fonctionnels homologues aux gènes *eps1-9*

30 [0072] On prépare des dérivés fonctionnels des gènes *eps1-9* en mettant en œuvre une méthode adaptée de celle décrite par Adams et al. (EP402450; Genencor). Pour cela, on isole chacun des gènes *eps* par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche *Lf5* (CNCM I-800). Les amores utilisées sont choisies à partir de la séquence SEQ ID NO:1, de sorte à amplifier uniquement chaque gène. On clone chaque produit de PCR dans le vecteur d'expression pQE60 (Qiagen, US) fonctionnellement en aval d'un promoteur *E. coli* régulant la transcription et la traduction du gène *eps*. On soumet enfin chaque vecteur à une mutagénèse chimique *in-vitro* avec de l'hydroxylamine, comme décrit par Adams et al..

[0073] On transforme la souche *E. coli* DH5 α (Stratagen, US) qui ne possède pas naturellement d'activité glycosyl-transférase, par les plasmides pQE60 traités avec l'agent mutagène, puis on sélectionne des transformants.

40 [0074] Pour identifier parmi les transformants des gènes *eps* codant pour des variants d'enzymes, on analyse la spécificité enzymatique des enzymes exprimées dans chaque clone d'*E. coli*, au moyen de la méthode décrite à l'exemple VI. L'analyse des gènes *eps* portés sur les plasmides pQE60 des clones ainsi sélectionnés montre que ceux-ci ne diffèrent du gène *eps* original que par la substitution, la délétion ou l'addition d'un petit nombre de bases nucléotidiques conduisant à des modifications de la séquence en acides aminés de la glycosyltransférase.

Exemple VI Synthèse de polysaccharides avec les glycosyltransférases de *Lf5*

50 [0075] On isole chacun des gènes *eps* codant pour une glycosyltransférase par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche *Lf5* (CNCM I-800). Les amores utilisées sont choisies à partir de la séquence SEQ ID NO:1, de sorte à amplifier uniquement chaque gène. On clone chaque produit de PCR dans un vecteur d'expression pQE60 (Qiagen, US). Les vecteurs ainsi traités sont ensuite introduits dans la souche *E. coli* DH5 α . On cultive les souches DH5 α transformées dans du milieu LB contenant de l'ampicilline jusqu'à une OD₆₀₀ de 0,8, on ajoute au milieu de culture 1 mM d'IPTG, on incube les cellules pendant 2 h, on centrifuge les cellules à 6000 g pendant 10 min à 4°C, on les lave dans le tampon A (50 mM de Tris-acétate pH8, 1 mM de DTT, 1 mM d'EDTA et 10% de glycérol), on les centrifuge à nouveau, on re-suspend les cellules dans le tampon A contenant en outre 1 mM de PMSF (fluorure de phénylméthane sulfonyle) et on soumet la suspension à 15000 psi. On élimine les cellules entières par centrifugation à 6000 g pendant 15 min à 4°C, on récupère les membranes cellulaires du surnageant par ultracentrifugation à 100000 g pendant 1 h, et re-suspend l'Aliquot dans le tampon A. Ce protocole permet ainsi généralement d'obtenir environ 10 mg/ml de protéines.

EP 0 957 170 A1

[0076] Parallèlement, on cultive la souche Lfi5 dans un milieu contenant du D-Glc_p, D-Gal_p et L-Rhap, on soumet les cellules de cette culture à 20000 psi, on extrait des membranes les chaînes saccharidiques en formation (liées à une amorce) en traitant les débris cellulaires avec du chloroforme/méthanol (2:1) et en évaporant l'extrait. A titre de témoin dans les essais qui vont suivre, on procède de la même manière avec la souche Lfi5 cultivée en présence de sucre radioactifs.

[0077] On détermine ensuite la spécificité des glycosyltransférases présentes dans les membranes par un procédé similaire à celui décrit par Kolkman *et al.* (Mol. Microbiol., 26, 197-208, 1997). Pour cela, on fait réagir pendant 2 h, dans un volume réactionnel de 150 µl, 100 µl (environ 1 mg) de membranes, 50 mM de Tris-acétate pH8, 10 mM de MgCl₂, 1 mM d'EDTA, 1 µl (environ 25 nCi) d'UDP^[14C]-Glc_p, d'UDP^[14C]-Gal_p ou de TDP^[14C]-Rhap selon la glycosyltransférase considérée, et le dépôt contenant les chaînes saccharidiques en formation non-marquées isolées de la souche Lfi5 (voir le paragraphe ci-dessus). Pour arrêter la réaction, on ajoute au volume réactionnel 2 ml de chloroforme:méthanol (2:1), on agite vigoureusement le mélange, et on le laisse reposer pendant 30 min. On élimine les sucres nucléotidiques en extrayant la phase organique 3 fois de suite dans 0,4 ml de PSUP (pour 1 litre: 15 ml de chloroforme, 250 ml de méthanol, 1,83 g de KCl et 235 ml d'eau). La phase inférieure contenant toutes les chaînes saccharidiques liées à une amorce est ensuite séchée sous vide, resuspendue dans 200 µl de 1-butanol et séparée dans deux tubes.

[0078] Dans la première série de tubes, on détache les oligosaccharides de leur amorce en effectuant une hydrolyse douce dans 50 mM de TFA (ac. trifluoroacétique) à 90°C pendant 20 min.

[0079] Dans la deuxième série de tubes, on soumet les oligosaccharides à une hydrolyse poussée dans une solution de 4M TFA pendant 1 h à 125°C

[0080] On séche ensuite les hydrolysats et on les resuspend dans 5 ml de sucres transporteurs dans 40% d'isopropanol (5 mg/ml de chaque sucre suivant: Glc, Gal, GaIN, maltose, maltotriose, maltotetraose). Les sucres hydrolysés de chaque série de tubes sont alors déposés sur une plaque HPTLC silicagel 60 (Merck) que l'on soumet à un éluant composé de chloroforme, d'acide acétique et d'eau (respectivement 6:7:1). On autoradiographie ensuite la plaque pendant 16 à 24 h avec un film Biomax MS (Kodak). On visualise les sucres transporteurs en diffusant sur la plaque une solution d'éthanol comprenant 5% d'H₂SO₄, et en chauffant la plaque à 100°C pendant 15 min. L'analyse des plaques permet ensuite l'identification précise des fonctions enzymatiques codées par les gènes eps de la souche Lfi5.

50

35

40

45

50

EP 0 957 170 A1

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE
(B) RUE: 55 AVENUE NESTLE
(C) VILLE: VEVEY
(D) ETAT OU PROVINCE: VAUD
(E) PAYS: SUISSE
(F) CODE POSTAL: 1500

(ii) TITRE DE L' INVENTION: BACTERIES LACTIQUES PRODUISANT DES EXOPOLYSACCHARIDES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 12

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0. Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 9217 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:1323..1982
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "esp1"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:2074..3174
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "eps2"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:3246..4373
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "eps3"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:4511..5317
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "eps4"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:5335..6204
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "eps5"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:6709..7692
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "eps6"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:9..353
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "eps7"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:516..1292
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "eps8"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT:7723..8784
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= "eps9"

EP 0 957 170 A1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

5	GGCCAACTAT GCACTCTAYT TTCAATGTAT CCAANNGCAA CSGCTTGACC ACTTTGTTGA CTAGCCGCTC TATGAAATG GACGCAAACA CGCGTATCGG CGAAAGTGGT GTAGAGAAC	60 120
	TGTCATCTT GACGGCAGGT CCAATTCCCG CAAACCCATC AGAACCTCTG TCTTCCAAGC ATATGTTGGA TTGATTGAA GATTTAAAGC AAGAATATGA TATGGTCGTG CTTGACTTAG	180 240
10	CACCGATCTT GGACCGGGC GAAACCCAGC AACTGACCAAG TCTCTGGAC GGGACGATCT TGGTTGTGCG CCAGTCATAT TCACAGAAAGT CAGCGGTTAA GCGGGGGAGT TGAGCTACTT AAGCTGACTA AGTCACCAAT TTAGGTATG TTATGAACG ATGTTGATGC CGATGGGAT GAGACGGCTA TGGTACCGG TABGGCTATG GTTACGGCTA CGGATATGCC GAAGAAGAGG	300 360 420 480
	AGAAGAAGGG GCTCTTGGG AGAAAAGAGT AGCTCATGCC GGTAGTTGAT TTACATTGTC ACATCTTACCG AGGAATCGAC GATGGTTCAA AGCTTCACTT AAGCTCGCTA	540 600
15	GAGCCGGGT TGCGATGGC GTAACCCATG CTTTGTGAC TCCACACACA TAAATGCC GCTACACCAA CCACAAAGCAA GATGTGATCA AGTTGACGGA AGAGTTCA GACGGGATTG ACCAAGCGGG TATTCGGCTG ACGGTCTTTC CAGGACATGAGT AGTCAGATTG TCAGGTGGCT TAATGAAAGC TCTTACAAAT GATGACATCC TCTTCTGCGA TGAAGGGGA CACTACATGC	660 720 780 840
	TCTTGGAAATT GCCAAAGCAAT GAAAGTGCAC CTTTGTGAC ATTACACCAA GAACATGGT CCAGAAGAGG GATTAGCCA ATCGTGTTC ACCCAGAACG GAATAAAAAAA ATTCTGCCAA	900 960
20	ATCCGAGAA GTTGAAGAA TTCTTGGAAA TGGGAGTTT GGTACAGATC ACTGCCAGCT CATATACTGG CTGTTTGGC AAAGAATTCG AAGACTGCA CGGGGAGTTT ATCAAGGCTG GACAATGTC CTGTTTGGC AGTGTGCTC ATGATTGCG AAGCTACTG GTGAAGCACT GGATAAGTTG GCGAAAGAAT TTGGTGAAGCA TAAGAACAG AAGTATTAG ATAACGGCA AGCGGTAATC ATGGCGATC CGGTTACTT GAACGGCAA CCTTACCGA	1020 1080 1140 1200 1260
	AGAAGCGCA GAAGTCTTAA GGTCTGTTT AAAGTGGAAA TTGGTGTGAA GGGGAGGAAA AAATGGATAT GGGATATAGC AGTACTTCAG CATACTTAA ACAGTCCAA GTCAAGGGCC GTCTCTCTA CCATGGATC AAGCGTCTC TTGACTTTCTC GGCTTCTCA ATTGCCTTGA	1320 1380 1440
25	TTCTATTGTC GCCACCTTTT TTGTCCTGG CAATCAAGAT TCATGTGAA GACGGCGAC CACTCTTTA CTCACAAATC AGAATTGGCA AGGATGAAA GCCTTCCGG ATCTACAGT TTCGGTCTCAT GTGGTCAAGC GTGAGAACAG TGAAGAAGGA TCTGCTGGAG CAAAATGAAG TCGAAGGGC CATOTTAAG ATOCATGATG ACCCGGGAT CACTAAGATT GGCAAGTTCA	1500 1560 1620 1680
	TCAGAGCACA CAGCTTGGAT GAATTCCTC AGCTTGGAA TGTGCTGATT GGGAAATATGT CACTGGTGGG GCCTCGGCCA CGCTTGCCTA ATGAGTTGA ACAGTATACT GACTATGACA AGCAGAGATT GCTGTTAAA CCAGGTGCA GTGGCTTTC GCAAGCAACT AGCCGGAAATG	1740 1800 1860
30	CGGCTGATTT TGCGGATATG GTGAGCTCG ACATGGAGTA CTTAATTCGG AGTGGCGTCT TCTTGTGATCT GTGGATCATT TCAAGACAA CTTGGTGTAT CTGGCACCCG AACGGGATGT AGATGTATGA CGAGAATGAC GAATAAGCTA TATGGAAAAG TGGCTAAGCA CTGGTGTTC TTCAAGAGCG ATGATTATA GGTTAGGT CATATGAAA GAAATAATAA ACCTGGCTG	1920 1980 2040 2100
	CTCTACTTCG TCGAAGCGAT GGCGGGCGGG GTTTTACAT ATATGTTGA TCTAGCAAAT AGCCTAGTG ATGATTGGG TGTATTATT GTGTTATGCA TGCGCAACAA AACACCTCAA AATTATCGAG ATGATTTCGA TGAACCGATG CACTAATCG AGCTTAAAGA TTTCGTCTGT	2160 2220 2280
35	AGTACTAGCA TCACGAAAGC AACAAAGCA GGACAAGAGA TGAAAAGGAT AGCAAGGCT ATTCCGGCAG ATGTTATTCA TCTACATTCT AGTATTGCA GAGCAATTGG ACGTGTCGTC TTAACACAA AGAAAACGCC GGCTTTTAT ACTCCACATG TTACAGCTT CTTAATGCAA GGCGAGAGTA GCAAGAACAG CTGGCGTAT AAGTTGGTAG AGCAGTTTG CGCGAGAGC	2340 2400 2460 2520
	CAAGCAACGA CCAATTCATG TAGCCCTGGT GAGTATCAAG AGCTTAAAGA AGTCTCTAAA CATGCCGTGG AAGTGTATAA TGGTATCAC ATGAACAAAT TCGAAAGAATT GATAGACACG ACGGACGCTT CGAAGATTGA TCATTTGAC GTTTTACAC TGGGGCGTAT CTCAGTACAG	2580 2640 2700
40	AAGAAATCCAA ATGTTTCAA TGAGGTGCA TTGAAGTTGT CGAATTAAA ATTGTTGTGG ATTGGCGATG GTGAAATTACG TTCAAGAGCTA ACTGCTCCGA ATATTACTGT TACCGGTTGG TTAACCGCTC ATGAGGGCTT AAGTACTCA CTTAATAGTG ATACTTATG CTAACTCTCA	2760 2820 2880
	CTGTGGGAAAG GGTTACCGAT GAGCTTGTG GAAGCAATGT ACATGAAAGAA ATTATGTTG GTCACTGATG TCATCGTAA CCATGATGA ATCAATGATG GTGTTAATGG GTATGATGT CAGACCGTTA ATGATTAAA TAATGAAATC TCAATGATGC GGGGGGCTCG CTATTCTCTG	2940 3000 3060
45	ATTGATTGTC CTTATAAGA TGTATTAGAA CGCTACAATA CTAAAGTAGT GTCTAAAGCC TATGATCAAC TTATACAGC AGCAATCAAG ATAGTGAGT GTTACGTGCT ATAAACCTTA AATTTTACTG AATAGTATCT GCTTGATTA TTATCTTC AATCAACTTC TGCGAGAAAAA ATCTTATGCA GAAAATACGT GTGTTCATG TGGCTGAAGC TGCAGGTGGA GTGAAAGAT	3120 3180 3240 3300
	ACTTGTATGC ACTGTTGAAG AACAGTGAT CTCAGAAGAT AGAGAACTAC CTTATAGCTT CCCAGCACTA TGAGATGGGG AAGTTAAA AATATGTTTC TGGTAATAC CAACTCAAA TGGCTCACGC AGCTTUTTTC AAAATGATA AGCTACAGT TAAGCAGATT AAAAACACAG	3360 3420 3480
50	TTAGACAGAT CAAGCCAGAT ATCGTCTATC CACATTCAAC TAAAGCTGGA GCGCTACTA GAATGGCTT GATGGGGATG CATATACAG TAATCTATAA TCCCCATGGT TGGCATTCA ACATGGCTCA GTCCAAGAAG AAAGAACTGG CTTACAGGCT GATTGAGAAG GTTCAAATT CCTTACTAA AAAAGTGTGCA TGATTTGCG AAGCAGAGAT GCAGTCGGCG ATGCAAAAC ATAATGTC GCAAGGATAAA ATCAAAATTA TTCCCAATGG TATTGATTG GATTTATTGG GACAATGG GCGCCTTAGT GAGCAGAAAT CCCAGATGT CTTTGTGAA ATGGCGGAGA	3540 3600 3660 3720 3780 3840 3900

EP 0 957 170 A1

5	AAATCAAGAA	AGAAATACCA	AATTCTGTTCT	TGGTGTGGT	TGGTGTGGC	AACCTTGAAG	3960
	CTGAGATTCG	TAGATTAATT	AAATCGAAAG	GTTTAGAGGA	TTCTTCTTGT	ATCACTGGAT	4020
	GGGTTGATAA	CCCGACCGGT	TATTTAAATT	GTTTCGATGT	ATCAACGCTT	CTGTCGAGAT	4080
	GGGAAGGCTT	TGGCTTGGCC	TTAGTCGAAT	ATATCTTATTG	CGGTGTGCCA	TTAGTTCAA	4140
	CCAAGGTGAA	TGCTATCCCA	TACGTAGTTG	ATGATGGCGT	TGACGGGTTA	TTGGTTGAAC	4200
10	CCGATAACCC	ATATGAGGCG	GCTAAGCGT	TAATCCGAT	TCACGAAGAT	CCTGCTTTAG	4260
	CAGCCAAATT	TGTGGCTAA	GGTTTGAAT	TTGCGAAAGA	TAAGTACGAC	TTTCGCCGAG	4320
	TCGCCAAACA	AACACTGAAA	TTATACATA	AAGTTTGCA	CAACTTAAA	TGAAGTGCAT	4380
	AATTGCGTT	GTATATTTAT	ACGTAACCGA	TAATCGCTT	AATACAAATG	GTGTGGGAA	4440
	AGCACTGAA	AGTGTGATAG	TTTATATGTTG	TGAATAGCTA	AATAAAATT	AGATAATTAG	4500
	GAGCAASCTT	ATGCCAARAG	TTTCAGTGT	TATCTCTATA	TATRATTGCA	AGAAACTATAA	4560
	ACCCCTAGAG	AAGAGTATTG	AATCAATTAT	TGATCAGACC	TACTCTGACT	GGGAGTTTAT	4620
	CATCTATAAT	GATGGGTGG	AAGACCATGG	TAAGACCTCA	GAGTATCTCA	AGAAATTGGG	4680
	TAACCGTGT	TCAAGGATCC	AAATCTGTA	TTGTCGAAAT	AATCATGGTT	TGGCATATGC	4740
	AAACGATGAA	ATGATCAAGG	TCGCAAGAGG	AGATTATAC	ACAGCTCAGG	ATGATGATGA	4800
15	TGTTTCGGAT	CCTATGCGGT	TGGCCCGAGA	ATAGAGCTTC	TTAAATAGGC	ACCCAGAGTA	4860
	TGCCCTTGT	GGTACTGTG	CGAAAGTTTT	TGATAATAGT	GGTACGTGGG	GACACTATGG	4920
	ATTGAAAGAG	AAACCAACTA	AGAAATACTT	TTTATGGAAT	AGTCAATTTC	TTCACCCATC	4980
	TGTGATGTT	AGACATGAA	TGTAGATCA	AGTAAATGGG	TACCGTGTG	CCAAGGATAC	5040
	TATGCTGCA	GAAGATTATG	ATCTTACCT	CAGACGTGT	GCTAAAGGTT	ACAAAGGATA	5100
	TAATATTCTAG	GAGGATTATAT	ACGAATATAG	GATTGAAAAT	AAATCCAAAT	AGAAATATAG	5160
	GCCGATGAGT	GACCGTATT	AAGAAGCAA	GGTTCGATAT	AAGGGGTTTA	AGTCTTTGG	5220
	CATGTTAACG	AAGGGGATTC	CGTATTTAT	TAAGCCCATC	TTAATTGGAT	TAATTCCGCA	5280
20	GAAGATATT	TATATAATT	GTAAAGATCC	TTACTAGTGT	GAGGTAACCC	TATAATGTAC	5340
	AAGAATGATT	TATCTTGT	CATGTCAAAG	ATATTGGGA	GACTACCGC	TTAAAGAATT	5400
	AGTGTAAAT	TTAATATCTA	TCGTATCAA	CAAATTAGGA	AGCAATTAAC	TCCCTGTTT	5460
	GACGAGGCGT	ATGAAACATT	TACCGATAT	GATAGCCATA	AAGTAAACGA	TACCGATATGG	5520
	ATTTTTGGT	GGCAAGGTTG	AGATAGTATG	CCTAAGGTAG	TGAAAATATG	CTATCGCTCT	5580
	ATCCACACAG	ATCGAGGTA	AAAATATAT	GTTTGTATCA	CTCAAGACAA	TATTAACACAA	5640
	TATACAGACA	TCCCTAAATT	TATTTACGAC	AAATGGATA	AAGGGTAAAT	CACTTATACC	5700
25	CATTTTTCGG	ATATTGTGAG	GGCGAATTAA	ATCAAAATA	ATGTTGGACT	TTGGATGGAT	5760
	GCTACGCTGT	ATGTTACCTC	TTCGCTAGAC	AAATTGACCC	TTAAAAAATT	TTTTTATTGT	5820
	AGTGGCTATC	TGCTGTATAC	CTTAATGTT	AGTGTGGGAC	GTGTCGACGGG	TTTTTTATG	5880
	GGCGGCCCTA	GGCGAATGGA	CCTTTTCT	TTTATGATC	GTCTATATGA	AGTATATTGG	5940
	CGAGATCAG	AAAAGCTGTT	TGATTATTT	TTGATAGATT	ATGATTGGG	TTATGCTTGG	6000
	AAAAAAGATT	TAAGTCGTT	TAATTCGTA	GAAGGAGACTT	ATAACAAAAA	TAATCCTCAT	6060
30	CTGTCGAT	TGCAAGGAT	GTAAAACCAA	CCGTATGTG	ATAAAGAGTG	GAAGAGAATA	6120
	ACTAGCATA	CAAGCGTATT	TAACATGTC	TACAAGAAA	AGGTAGATT	TGATRAAAAG	6180
	GAAAGCTATT	ACAATAGATT	GTGAAAATGA	AAGACATGAC	TTAAAGAATT	CTATTGCAAT	6240
	GACGACCTAC	AACGGAAGTC	AGTACATTG	AGAGTTATT	GATTCTCTTC	GCACACAGAC	6300
	ACGCTCTGTT	CAAGAAGTTA	TGTCCTTAC	TTCCATTGCG	AATGATCCAG	CACTGTTAGC	6360
	TGTGACTGTT	AGCTGTGATT	GAAGATTTA	CAGCAGGCC	GCCATGTTGATT	ACTACGTATT	6420
	CAGGTGGGAT	TCCTGACTAT	GGCGATAAGA	AAGATGCCAT	TATCTTGCCTG	ATAATGACC	6480
35	AGTGTGTTG	GAATTTAGTT	ATTCGTTAA	CCAATTAGC	TAACGACAAG	AAATTGCGTA	6540
	TTAGTCCTG	ATAAGACGAT	AAAAGAAGAA	GTCAGACATG	GACTAAGGAA	AGTTTTATG	6600
	ATGACTTTG	AAAATAGTA	GGTTAGTGT	GTGATAGCA	GTATGATCC	TAATCTAACG	6660
	TATGCGTCAG	CACTAAAAG	TCAGGTTGT	AGGAAAGAA	TCATTGTAAT	GAAGTTAACG	6720
	ATTATTGTC	CTGTTTATAA	AGTGGAAAGA	TATTTGAAAG	ACTGTGTAAT	TTCGATTTTA	6780
	AATCAGACTT	TTCATGATT	CGAGCTCATT	CTTGTAGATG	ACGGTTCAC	AGATTCAATG	6840
	CCTAAATGAA	TTCATGATAA	TTCTCAAAG	TTAAAGTATG	TCAACAAACAA	6900	
40	AATGGCGAT	TGTCTAGTC	TAGAAATGTC	GGTATGAAAG	TAGCAACTGG	AGAGTATATT	6960
	TCTTTATTG	ATAGTGATGA	TTATCTGCC	TCAACATGT	ATGAGCATGT	ATTTTCGATT	7020
	ATGAAAAAAG	ATATGCTGTA	TATGTTGTG	GTGGCAGAT	GCTATGTTA	CCCAATGGT	7080
	TCCAAAAAAT	TAAGAGAGAA	ACAGATGTG	TATCAAGTTA	GGGATGGCC	TAAAGCAACG	7140
	GCCATAATGA	ATACATCTT	GTTCAGGTA	TTTGATGCTG	CAGCTGGGA	TAAGTATAT	7200
	AAACGAGCT	TGTTTAATGA	CGTCACTTAT	CCCCAGGGGA	AACAACTGTA	ACATTGGTAT	7260
45	ACTACATATA	AAGTGTGTC	AAAAGCTAAT	AGAAATAGTT	ATGATTCAC	ACCCATGTAC	7320
	TATTACAGAC	AACGTGGAGG	AAAGTATTAC	CATAACAAT	CTACAGTTAA	TTATGACGCA	7380
	ATGTGCTA	GTGAGAAAGT	CTATGATTTC	GTAAAAAAGA	GACAACCGGA	GTATACGGCT	7440
	GAACCAAATT	TTTCATATGT	TTTTCAAGA	ATTGGAGTTA	TAGACAAATT	AACGTGTCAG	7500
	CCTACTGTTG	ATAAACAAAA	AAATTAGGAA	ATACGTAAATC	ATATGAAGGC	AAATATTTAA	7560
	CAGTAAAAAA	AGACGACTG	TTTTTCTAAG	TGAGTAAAAA	AAAGAAAAT	ACAAITGTTT	7620
	TTAATTGAGC	ATTCCTTAA	CTCATATAC	TTTATTTTA	GGCGTGTAAA	AAGCCTTGGC	7680
	ATATCAGATT	AAAATAAAC	ATAACTACAA	AGGATAAAGA	ATATGCTGT	ATTTTTGGG	7740
50	CTGCTAATT	TTTGTGTAAT	ATCCTCAATC	ATCGGGGGGG	GACTAAACAT	AAATAGATT	7800
	GACATTAGAG	CAAAGATAGT	AGATGTATTA	CTTTCCTTGT	CTTGTGTTGT	TGTATCTGCA	7860
	TTTAGGTATC	AAGTTGGTAA	CGACTACGGT	ATATATGTCG	GTACCTATGA	TTTAATTAAA	7920
	ACAGGACAGC	AAGCGAGAAAT	CGATATCTTC	ACTTATTGGG	TTATGAGGT	AATGGCTAGC	7980

EP 0 957 170 A1

TTGAATCTTG ACGTCAGTA CTTTTTTATT GTTTCTAGTT TTATTGTAAA TTATCTAATC 8040
 TACTTAGCTG TTCGAGATCA ATCAAAAGAT AGAACACTTA GTTATTATAT ATATATATGT 8100
 GGGACTTAT ATTTGCTCTC AATGAACACA GTTCGCCAGA TGATGAGTGT TGCTATGTTT 8160
 TACTTTTCA TGAATATGT CGAAAGCAAT AATTGGAAAA AATATTTTTT ATGTAATTG 8220
 ATAGGTGGAC TTTTCACCA AACAGCTTTT ATATCCCTGC CCATATATT TGTTTTAAAG 8280
 AGATATATGG GGTGGAAGAA ATATTTAGTA GTAAATTATA TAGCTATAGC ACTCAAGAAC 8340
 CCAATCGTTA ATCTGCTTAA TGGGCTTATC TAAATTCAA AATATCGAT GTATGTCACT 8400
 TATTCCAATC TTGCAAATAC AGCGTGGGGA GGATGGAAGA TAAGCAATT TATTAATTTA 8460
 ATATTATTATC TAGCATACTG CCTTTGCTT AAAATAAGG ATACTGAAGA TAGTATATAT 8520
 ACTAATATTC ATTTGTTGG CGTACTATGT TCGATTTAC TACTTGTAT CCCGGGTTGGT 8580
 GACAGAATTG TTCTTGGGTT TAGATTATC GAATTATTAAGTGTACCCAA CTTACTCTAT 8640
 AAATTAAGT TAAGAAAATC AGCTATATT ATTTGAGTT TAGTAATTGC AGTACTATAC 8700
 TTGTTTACT TTGCTATAC GATCGGCGTA CAAATGGTA ATTCTGTACT GCCATACGTG 8760
 ACAACCCAT TTTCAATAAA CTAATAGTAA TTGATAGGA GTAGAACGTT GAAGTTTTA 8820
 ATAATTGATG ATGAAACGTAG CCTCTATAAAA GCTATGTTCA GTGATTGAT AAATAGCTCG 8880
 GATAAAAATA TTTCTGAGGT ACTTATATTC AGTCAAATGC CAAGATATCT ATCGGTTGCT 8940
 AAGCCAAATGG TATTAAATGA TCGGATTAAT CGACATGTG GGCTACCGTT CAAAAAAACA 9000
 TATGATAATC ACTATTCTCTCACATCAT AACTTTGATA AAAGCGAAAA ATACTGGGT 9060
 GTGATGCTAA CGAACACATT AAATACACAC TATTCGGTAAATATAGC ACCATTAAA 9120
 AAGGAAAAAC CGAATGTCAA GTTUCACIT ATCATGTACG ATCATTTCGG AAATCGAGCT 9180
 GCAAGAAGAG TTAAAAAAACT TTACCGTTT TTGATC 9217

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 219 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Asp Met Gly Tyr Ser Ser Ser Pro Ala Tyr Val Lys Gln Ser Lys
 1 5 10 15
 Val Lys Gly Arg Pro Leu Tyr His Gly Ile Lys Arg Leu Phe Asp Phe
 20 25 30
 Leu Ala Ser Ser Ile Ala Leu Ile Leu Leu Ser Pro Leu Phe Leu Trp
 35 40 45
 Leu Ala Ile Lys Ile His Gly Glu Asp Gly Gly Pro Val Phe Tyr Ser
 50 55 60
 Gln Ile Arg Ile Gly Lys Asp Glu Lys Pro Phe Arg Ile Tyr Lys Phe
 65 70 75 80
 Arg Ser Met Val Val Asn Ala Glu Lys Leu Lys Lys Asp Leu Leu Glu
 85 90 95
 Gln Asn Glu Val Glu Gly Ala Met Phe Lys Met His Asp Asp Pro Arg
 100 105 110
 Ile Thr Lys Ile Gly Lys Phe Ile Arg Ala His Ser Leu Asp Glu Leu
 115 120 125
 Pro Gln Leu Trp Asn Val Leu Ile Gly Asn Met Ser Leu Val Gly Pro
 130 135 140
 Arg Pro Pro Leu Pro Asn Glu Val Glu Gln Tyr Thr Asp Tyr Asp Lys
 145 150 155 160
 Gln Arg Leu Leu Val Lys Pro Gly Cys Ser Gly Leu Trp Gln Ala Thr
 165 170 175
 Ser Arg Asn Ala Ala Asp Phe Ala Asp Met Val Gln Leu Asp Ile Glu
 180 185 190
 Tyr Ile Asn Arg Ser Gly Val Phe Phe Asp Leu Trp Ile Ile Phe Lys
 195 200 205
 Thr Ile Gly Val Met Phe His Pro Asn Gly Met
 210 215

55

EP 0 957 170 A1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 366 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Met Lys Gly Asn Asp Lys Pro Arg Leu Leu Tyr Phe Val Glu Ala Met
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Val Phe Thr Tyr Ile Val Asp Leu Ala Asn Ser Leu Val
 20 25 30
 Asp Asp Trp Asp Val Tyr Ile Gly Tyr Ala Met Arg Asn Gln Thr Pro
 35 40 45
 Gln Asn Tyr Arg Glu Tyr Phe Asp Glu Arg Val His Leu Ile Glu Val
 50 55 60
 Lys Asn Phe Ala Arg Ser Thr Ser Ile Thr Lys Ala Ile Lys Ala Gly
 65 70 75 80
 Gln Glu Met Lys Arg Ile Ala Lys Ala Ile Arg Pro Asp Val Ile His
 85 90 95
 Leu His Ser Ser Ile Ala Gly Ala Ile Gly Arg Val Val Phe Asn Thr
 100 105 110
 Lys Lys Thr Pro Val Phe Tyr Thr Pro His Gly Tyr Ser Phe Leu Met
 115 120 125
 Gln Gly Glu Ser Ser Lys Lys Arg Leu Ala Tyr Lys Leu Val Glu Gln
 130 135 140
 Phe Cys Gly Lys Ser Gln Ala Thr Thr Ile Ala Cys Ser Pro Gly Glu
 145 150 155 160
 Tyr Gln Glu Ala Leu Lys Val Ser Lys His Ala Val Glu Val Asp Asn
 165 170 175
 Gly Ile Asn Ile Glu Gln Leu Gln Glu Leu Ile Asp Thr Thr Asp Ala
 180 185 190
 Ser Lys Ile Asp His Tyr Asp Val Phe Thr Leu Gly Arg Ile Ser Val
 195 200 205
 Gln Lys Asn Pro Asn Val Phe Asn Glu Val Ala Leu Lys Leu Ser Asn
 210 215 220
 Leu Lys Phe Leu Trp Ile Gly Asp Gly Glu Leu Arg Ser Glu Leu Thr
 225 230 235 240
 Ala Pro Asn Ile Thr Val Thr Gly Trp Leu Thr Arg His Glu Ala Leu
 245 250 255
 Lys Tyr Ser Leu Asn Ser Asp Thr Phe Met Leu Thr Ser Leu Trp Glu
 260 265 270
 Gly Leu Pro Met Ser Leu Leu Glu Ala Met Tyr Met Lys Lys Leu Cys
 275 280 285
 Val Val Ser Asp Val Ile Gly Asn His Asp Val Ile Asn Asp Gly Val
 290 295 300
 Asn Gly Tyr Val Cys Gln Thr Val Asn Asp Phe Tyr Asn Arg Ile Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Gly Gly Ala Arg Tyr Ser Leu Ile Asp Cys Ala Tyr Lys Asp
 325 330 335
 Val Leu Glu Arg Tyr Asn Thr Lys Val Val Ser Lys Ala Tyr Asp Gln
 340 345 350
 Leu Tyr Gln Ala Ala Ile Lys Asn Ser Glu Cys Phe Cys Leu
 355 360 365

5

10

15

20

25

30

35

40

45

55

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 375 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

EP 0 957 170 A1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Met Gln Lys Ile Arg Val Val His Val Ala Glu Ala Ala Gly Gly Val
 1 5 10 15
 Glu Arg Tyr Leu Tyr Ala Leu Leu Lys Asn Ser Asp Ser Gln Lys Ile
 20 25 30
 Glu Asn Tyr Leu Ile Ala Ser Gln His Tyr Glu Met Gly Lys Phe Lys
 35 40 45
 Lys Tyr Val Ser Gly Glu Tyr Gln Leu Gln Met Ala His Ala Ala Cys
 50 55 60
 Phe Lys Asn Asp Lys Ala Thr Val Lys Gln Ile Lys Lys Thr Val Arg
 65 70 75 80
 Gln Ile Lys Pro Asp Ile Val Tyr Ala His Ser Thr Lys Ala Gly Ala
 85 90 95
 Leu Thr Arg Ile Ala Leu Met Gly Met His Ile Pro Val Ile Tyr Asn
 100 105 110
 Pro His Gly Trp Ala Phe Asn Met Ala Gln Ser Lys Lys Lys Glu Leu
 115 120 125
 Ala Tyr Arg Leu Ile Glu Lys Val Gln Ile Pro Phe Thr Lys Lys Val
 130 135 140
 Val Cys Ile Ser Glu Ala Glu Met Gln Ser Ala Met Gln Lys His Ile
 145 150 155 160
 Cys Ser Lys Asp Lys Ile Lys Ile Ile Pro Asn Gly Ile Asp Phe Asp
 165 170 175
 Leu Leu Asp Lys Val Gln Pro Val Thr Arg Arg Asp Leu Gly Ile Leu
 180 185 190
 Glu Asp Ala Phe Val Val Gly Gln Ile Gly Arg Leu Ser Glu Gln Lys
 195 200 205
 Ser Pro Asp Val Phe Val Glu Met Ala Glu Lys Ile Lys Lys Glu Ile
 210 215 220
 Pro Asn Ser Phe Phe Val Met Val Gly Asp Gly Asn Leu Glu Ala Glu
 225 230 235 240
 Ile Arg Arg Leu Ile Lys Ser Lys Gly Leu Glu Asp Ser Phe Leu Ile
 245 250 255
 Thr Gly Trp Val Asp Asn Pro Thr Gly Tyr Leu Asn Cys Phe Asp Val
 260 265 270
 Ser Thr Leu Leu Ser Arg Trp Glu Gly Phe Gly Leu Ala Leu Val Glu
 275 280 285
 Tyr Met Tyr Cys Gly Val Pro Leu Val Ser Thr Lys Val Asp Ala Ile
 290 295 300
 Pro Tyr Val Val Asp Asp Gly Val Asp Gly Leu Leu Val Glu Pro Asp
 305 310 315 320
 Asn Pro Tyr Glu Ala Ala Lys Ala Val Ile Arg Ile His Glu Asp Pro
 325 330 335
 Ala Leu Ala Ala Lys Phe Val Ala Asn Gly Leu Ser Ile Ala Lys Asp
 340 345 350
 Lys Tyr Asp Val Arg Arg Val Ala Lys Gln Thr Leu Lys Leu Tyr Tyr
 355 360 365
 Lys Val Leu His Asn Leu Lys
 370 375

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 268 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Met Pro Lys Val Ser Val Ile Met Ser Ile Tyr Asn Cys Lys Asn Tyr
 1 5 10 15
 Lys Ala Leu Glu Lys Ser Ile Glu Ser Ile Ile Asp Gln Thr Tyr Ser
 20 25 30

EP 0 957 170 A1

Asp Trp Glu Phe Ile Ile Tyr Asn Asp Gly Ser Glu Asp Asp Gly Lys
 35 40 45
 Thr Ser Glu Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Lys Arg Asp Ser Arg Ile Gln
 50 55 60
 Ile Ile Asp Cys Pro Asn Asn His Gly Leu Ala Tyr Ala Lys Asn Glu
 65 70 75 80
 Met Ile Lys Val Ala Arg Gly Asp Tyr Ile Thr Ala Gln Asp Asp Asp
 85 90 95
 Asp Val Ser His Pro Met Arg Leu Ala Arg Glu Val Asp Phe Leu Asn
 100 105 110
 Arg His Pro Glu Tyr Ala Phe Val Gly Thr Val Ala Lys Val Phe Asp
 115 120 125
 Asn Ser Gly Thr Trp Gly His Tyr Gly Leu Lys Glu Lys Pro Thr Lys
 130 135 140
 Asn Thr Phe Leu Trp Asn Ser Pro Phe Leu His Pro Ser Val Met Phe
 145 150 155 160
 Arg His Glu Val Leu Asp Gln Val Asn Gly Tyr Arg Val Ala Lys Asp
 165 170 175
 Thr Met Arg Ala Glu Asp Tyr Asp Leu Phe Phe Arg Leu Tyr Ala Lys
 180 185 190
 Gly Tyr Lys Gly Tyr Asn Ile Gln Glu Asp Leu Tyr Glu Tyr Arg Ile
 195 200 205
 Glu Asn Asn Pro Asn Lys Lys Tyr Arg Pro Met Ser Asp Arg Ile Gln
 210 215 220
 Glu Ala Lys Val Arg Tyr Lys Gly Phe Lys Ser Phe Gly Met Leu Thr
 225 230 235 240
 Lys Gly Ile Pro Tyr Ile Ile Lys Pro Ile Leu Ile Gly Leu Ile Pro
 245 250 255
 Gln Lys Ile Phe Tyr Ile Ile Arg Lys Asn Arg Tyr
 260 265

26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 289 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Met Tyr Lys Asn Asp Leu Ser Phe Val Met Ser Lys Ile Leu Gly Arg
 1 5 10 15
 Leu Pro Ala Lys Arg Ile Ser Asp Lys Phe Asn Ile Tyr Arg His Gln
 20 25 30
 Gln Ile Arg Lys Gln Leu Thr Pro Val Phe Asp Glu Ala Tyr Glu Thr
 35 40 45
 Phe Thr Arg Tyr Asp Ser His Lys Val Asn Asp Thr Ile Trp Ile Phe
 50 55 60
 Trp Trp Gln Gly Glu Asp Ser Met Pro Lys Val Val Lys Lys Cys Tyr
 65 70 75 80
 Arg Ser Ile Gln Gln Asn Arg Gly Lys Lys Asn Ile Val Leu Ile Thr
 85 90 95
 Gln Asp Asn Ile Lys Gln Tyr Thr Asp Ile Pro Lys Phe Ile Tyr Asp
 100 105 110
 Lys Leu Asp Lys Gly Val Ile Thr Tyr Thr His Phe Ser Asp Ile Val
 115 120 125
 Arg Ala Asn Leu Ile Lys Asn Asn Gly Gly Leu Trp Met Asp Ala Thr
 130 135 140
 Leu Tyr Val Thr Ser Ser Leu Asp Asn Ile Asp Leu Lys Lys Leu Phe
 145 150 155 160
 Tyr Cys Ser Gly Tyr Pro Ala Asp Thr Phe Asn Val Ser Phe Gly Arg
 165 170 175
 Trp Thr Gly Phe Phe Met Gly Gly Pro Ser Gly Met Asp Leu Phe Ser
 180 185 190

55

EP 0 957 170 A1

(2) INFORMATIONS DÉPOSÉES SUR LE N° 2.

INFORMATIONS POUR LA SBO ID NO: 7:
(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

(A) LONGUEUR: 327 acides aminés

(A) LONGUEUR: 327 acide
(B) TYPE: acide amine

(E) NOMBRE DE BRINS: simple

(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Met Lys Leu Ser Ile Ile Val Pro Val Tyr Lys Val Glu Glu Tyr Leu
 1 5 10 15
 Lys Asp Cys Val Asn Ser Ile Leu Asn Gln Thr Phe His Asp Phe Glu
 20 25 30
 Leu Ile Leu Val Asp Asp Gly Ser Pro Asp Ser Cys Pro Lys Ile Cys
 35 40 45
 Asp Glu Tyr Ser Gln Lys Phe Asn Asn Val Lys Val Val His Lys Gln
 50 55 60
 Asn Gly Gly Leu Ser Ser Ala Arg Asn Ala Gly Met Lys Val Ala Thr
 65 70 75 80
 Gly Glu Tyr Ile Ser Phe Ile Asp Ser Asp Asp Tyr Leu Ala Ser Asn
 85 90 95
 Met Tyr Glu His Val Phe Ser Ile Met Lys Lys Glu Cys Ala Asp Ile
 100 105 110
 Val Val Val Gly Arg Cys Tyr Val Tyr Pro Asn Gly Ser Lys Lys Leu
 115 120 125
 Arg Glu Lys Gln Asn Val Tyr Glu Val Met Asp Gly Pro Lys Ala Thr
 130 135 140
 Ala Ile Met Asn Thr Ser Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Ala Ala Ala Trp
 145 150 155 160
 Asp Lys Val Tyr Lys Arg Ser Leu Phe Asn Asp Val Ser Tyr Pro Glu
 165 170 175
 Gly Lys Leu Ser Glu Asp Trp Tyr Thr Thr Tyr Lys Val Phe Ala Lys
 180 185 190
 Ala Asn Arg Ile Val Tyr Asp Ser Thr Pro Met Tyr Tyr Arg Gln
 195 200 205
 Arg Gly Gly Ser Ile Thr His Thr Ser Ser Thr Val Asn Tyr Asp Ala
 210 215 220
 Met Tyr Ala Ser Arg Glu Val Tyr Asp Phe Val Lys Lys Arg Gln Pro
 225 230 235 240
 Glu Tyr Thr Ala Glu Ala Asn Phe Ala Tyr Val Phe Ser Arg Ile Gly
 245 250 255
 Val Ile Asp Asn Leu Thr Val Gln Pro Thr Val Asp Lys Gln Lys Ile
 260 265 270
 Arg Lys Ile Arg Asn Asp Met Lys Ala Asn Ile Lys Gln Leu Lys Lys
 275 280 285
 Thr Asp Cys Phe Ser Lys Leu Ser Lys Lys Arg Lys Ile Gln Leu Phe
 290 295 300
 Leu Ile Glu His Cys Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Ile Phe Arg Arg Val
 305 310 315 320

EP 0 957 170 A1

Lys Ser Leu Gly Ile Ser Asp
325

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:
(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:
(A) LONGUEUR: 114 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
(ii) TYPE DE MOLÉCULE: protéine
(xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE: SEQ ID NO: 8:

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 258 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLÉCULE: protéine
- (xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE: SEQ ID NO: 9

35 Met Pro Val Val Asp Leu His Cys His Ile Leu Pro Gly Ile Asp Asp
 1 5 10 15
 Gly Ser Lys Ser Trp Glu Ala Ser Leu Lys Leu Ala Arg Ala Ala Val
 20 25 30
 Ala Asp Gly Val Thr His Ala Leu Cys Thr Pro His Thr Leu Asn Gly
 35 40 45
 Arg Tyr Thr Asn His Lys Gln Asp Val Ile Lys Leu Thr Glu Glu Phe
 50 55 60
 40 Gln Asp Arg Ile Asp Gln Ala Gly Ile Pro Leu Thr Val Phe Pro Gly
 65 70 75 80
 His Glu Val Arg Leu Ser Gly Gly Leu Thr Glu Ala Leu Asp Asn Asp
 85 90 95
 Asp Ile Leu Phe Cys Asp Glu Glu Gly His Tyr Met Leu Leu Glu Leu
 100 105 110
 45 Pro Ser Asn Glu Val Pro His Tyr Thr Lys Asn Met Val Tyr Glu Leu
 115 120 125
 Thr Arg Arg Gly Ile Thr Pro Ile Val Val His Pro Glu Arg Asn Lys
 130 135 140
 Lys Ile Leu Ala Asn Pro Gln Lys Leu Gln Glu Phe Leu Glu Met Gly
 145 150 155 160
 Val Leu Val Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Thr Gly Leu Phe Gly Lys
 165 170 175
 50 Glu Ile Glu Asp Cys Ser Arg Glu Phe Ile Lys Ala Gly Gln Cys Ala
 180 185 190

55

EP 0 957 170 A1

10

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

(A) LONGUEUR: 353 acides aminés

(B) TYPE: acide amine

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

20	Met Ser Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Cys Val Ile Ser Ser Met
	1 5 10 15
	Ile Gly Arg Gly Leu Thr Ile Asn Arg Phe Asp Ile Arg Ala Lys Ile
	20 25 30
	Val Asp Val Leu Pro Phe Leu Ala Leu Phe Val Val Ser Ala Phe Arg
	35 40 45
	Tyr Gln Val Gly Lys Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Gly Thr Tyr Asp Leu
	50 55 60
25	Ile Lys Thr Gly Gln Gln Ala Arg Ile Asp Ile Phe Thr Tyr Trp Val
	65 70 75 80
	Met Lys Val Met Ala Ser Leu Asn Leu Asp Val Gln Tyr Phe Phe Ile
	85 90 95
	Val Ser Ser Phe Ile Val Asn Tyr Leu Ile Tyr Leu Ala Val Arg Asp
	100 105 110
30	Gln Ser Lys Asp Arg Thr Leu Ser Tyr Tyr Ile Tyr Ile Cys Gly Thr
	115 120 125
	Leu Tyr Phe Ala Ser Met Asn Thr Val Arg Gln Met Met Ser Val Ala
	130 135 140
	Met Phe Tyr Phe Ser Leu Lys Tyr Val Glu Ser Asn Asn Trp Lys Lys
	145 150 155 160
	Tyr Phe Leu Cys Asn Leu Ile Gly Gly Leu Phe His Gln Thr Ala Phe
	165 170 175
	Ile Phe Leu Pro Ile Tyr Phe Val Leu Lys Arg Tyr Met Gly Trp Lys
	180 185 190
	Lys Tyr Leu Val Val Ile Ile Ala Ile Ala Leu Lys Asn Pro Ile
	195 200 205
35	Val Asn Leu Leu Asn Gly Leu Ile Leu Asn Ser Lys Tyr Ala Met Tyr
	210 215 220
	Val Thr Tyr Ser Asn Phe Ala Asn Thr Ala Trp Gly Gly Trp Lys Ile
	225 230 235 240
	Ser Asn Phe Ile Asn Leu Ile Leu Phe Leu Ala Tyr Cys Leu Leu
	245 250 255
	Lys Asn Lys Asp Thr Glu Asp Ser Ile Tyr Thr Asn Ile His Phe Val
	260 265 270
40	Gly Val Leu Cys Ser Ile Leu Leu Leu Gly Ile Pro Gly Gly Asp Arg
	275 280 285
	Ile Phe Leu Gly Phe Arg Phe Ile Glu Leu Leu Ser Val Pro Asn Leu
	290 295 300
	Leu Tyr Lys Leu Lys Leu Arg Lys Ile Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Leu
	305 310 315 320
45	Val Ile Ala Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Phe Cys Tyr Thr Ile Gly Val
	325 330 335
	Gln Asn Gly Asn Ser Val Leu Pro Tyr Val Thr Thr Leu Phe Ser Ile
	340 345 350

EP 0 957 170 A1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLÉCULE: Autre acide nucléique
 (A) DESCRIPTION: /desc = "amorces"

(xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE: SEQ ID NO: 11:

GAYGARYTNC CNCARYTNWK NAAYGT

26

15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

(A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLÉCULE: Autre acide nucléique
 (A) DESCRIPTION: /desc = "amorces"

(xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCANHRNCCN GTNANCCNGG YTT

23

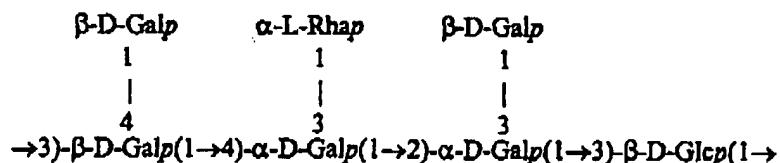
25

30

Revendications

1. Enzyme recombinée, susceptible d'être impliquée dans la biosynthèse de l'EPS ayant l'unité saccharidique répétitive

35



catalysant spécifiquement l'une des liaisons suivantes entre sucres:

45

- la liaison osidique β -1,3 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 3 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation, ladite chaîne étant composée d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et ledit sucre présent à l'extrémité non-réductrice étant lié à un seul autre sucre par son carbone 1;
- la liaison osidique β -1,4 entre le carbone 1 d'un D-Galp activé et le carbone 4 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation, ladite chaîne étant composée d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et ledit sucre présent à l'extrémité non-réductrice étant lié à un seul autre sucre par son carbone 1;
- la liaison osidique α -1,3 entre le carbone 1 d'un L-Rhap activé et le carbone 3 du sucre présent à l'extrémité non-réductrice d'une chaîne saccharidique en formation, ladite chaîne étant composée d'une chaîne principale de 1 à 4 D-Galp et/ou D-GlcP liés entre-eux par des liaisons osidiques α -1,2, α -1,3, β -1,4 et/ou β -1,3, et ledit sucre présent à l'extrémité non-réductrice étant lié à un seul autre sucre par son carbone 1.

EP 0 957 170 A1

2. Enzyme recombinée notamment selon la revendication 1, ayant la séquence en acides aminés choisie dans le groupe formé par les séquences SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, et les séquences qui leur sont homologues.
- 5 3. ADN recombinée codant pour une enzyme selon la revendication 1 ou 2.
4. ADN selon la revendication 3, comprenant au moins un gène ayant une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences délimitées dans la séquence SEQ ID NO:1 par les nucléotides 9-358, 516-1292, 1323-1982, 2074-3174, 3246-4373, 4511-5317, 5335-6204, 6709-7692, 7723-8784, et les séquences qui leur sont homologues.
- 10 5. Vecteur recombinant comprenant un ADN selon la revendication 3 ou 4.
6. Cellule comprenant, intégré dans son génome ou par le moyen d'un plasmide réplicable, un ADN recombiné selon la revendication 3 ou 4, et exprimant une enzyme recombinée fonctionnelle selon la revendication 1 ou 2.
- 15 7. Cellule selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie lactique.
8. Procédé de production d'un EPS, dans lequel (1) on clone dans un vecteur un fragment d'ADN codant pour au moins l'une des enzymes selon la revendication 1 ou 2, ledit vecteur comprenant en outre une séquence permettant la réplication autonome ou l'intégration dans une cellule hôte, (2) on transforme une cellule hôte par ledit vecteur, ladite cellule hôte utilisant les enzymes codées par le vecteur, le cas échéant en combinaison avec d'autres enzymes produite par la cellule hôte, pour la biosynthèse d'un EPS, (3) puis on cultive la cellule hôte transformée dans des conditions appropriées pour la production d'un EPS.
- 20 9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel le vecteur comprend en outre au moins une séquence promoteur fonctionnelle et au moins une séquence d'activation traductionnelle fonctionnelle, permettant l'expression des ADN codant pour au moins l'une des enzymes selon la revendication 1 ou 2.
- 25 10. Utilisation d'une enzyme recombinée selon la revendication 1 ou 2, ou d'un ADN selon la revendication 3 ou 4, pour la synthèse d'un EPS.
- 30

35

40

45

50

55

EP 0 957 170 A1

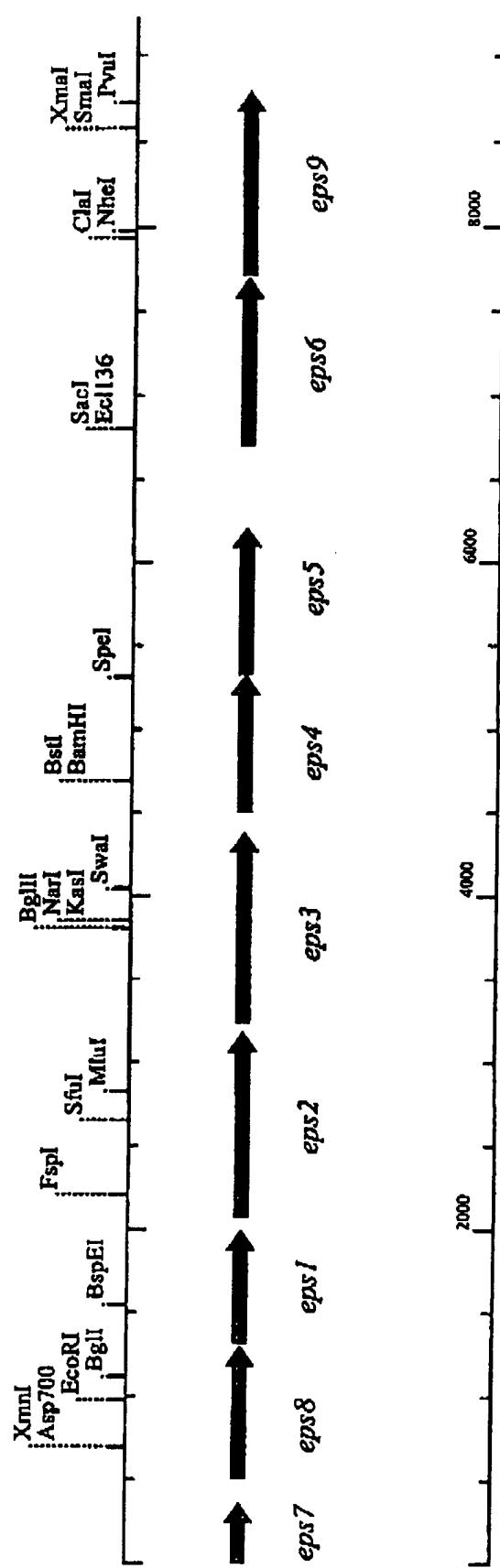


Figure 1

EP 0 957 170 A1

Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 98 20 1312

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concordante	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.)		
Y	GRUTER M ET AL: "Structural characterization of the exopolysaccharide produced by <i>Lactobacillus delbrückii</i> subspecies <i>bulgaricus</i> rr grown in skimmed milk" <i>CARBOHYDRATE RESEARCH</i> , vol. 239, 1993, pages 209-226, XP002081314 * abrégé * * figure 1 *	1-10	C12N15/52 C12P19/18 C12N9/10 C08B37/00 C1201/68 C12N1/21		
D, Y	GRIFFIN A M ET AL: "The <i>cpsABCDE</i> genes involved in polysaccharide production in <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> strain NCBF 2393" <i>GENE</i> , vol. 183, 1996, pages 23-27, XP004062722 * abrégé *	1-10			
A	EP 0 750 042 A (NESTLE SA) 27 décembre 1996 * abrégé * * revendications 1-11 *	1-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.)		
D, A	EP 0 750 043 A (NESTLE SA) 27 décembre 1996 * abrégé * * revendications 1-12 *	1-10	C12N C12P C08B		
D, A	STINGELE F ET AL: "HOMOLOGOUS INTEGRATION AND TRANSPOSITION TO IDENTIFY GENES INVOLVED IN THE PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDES IN <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> " <i>DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION</i> , vol. 85, 1995, pages 487-493, XP000603799 * le document en entier *	1-10			
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications					
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur			
LA HAYE	5 novembre 1998	Lejeune, R			
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS					
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention				
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date				
A : aperçu-plan technologique	D : cité dans la demande				
O : divulgarion non-déposée	L : cité pour d'autres raisons				
P : document intercalaire	A : membre de la même famille, document correspondant				

BEST AVAILABLE COPY